



**HAL**  
open science

# Inhibition de l'érythropoïèse par la voie $\text{TNF}\alpha$ /sphingomyélinase/céramide : rôle du réseau de régulation microARN/facteurs de transcription et impact sur l'autophagie

Marion Orsini

► **To cite this version:**

Marion Orsini. Inhibition de l'érythropoïèse par la voie  $\text{TNF}\alpha$ /sphingomyélinase/céramide : rôle du réseau de régulation microARN/facteurs de transcription et impact sur l'autophagie. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0225 . tel-01816339

**HAL Id: tel-01816339**

**<https://theses.hal.science/tel-01816339>**

Submitted on 15 Jun 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

**Thèse**

**Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

**Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »**

**par Marion ORSINI**

**Inhibition de l'érythropoïèse par la voie  
TNF $\alpha$ /sphingomyélinase/céramide : Rôle du réseau de régulation  
microARN/facteurs de transcription et impact sur l'autophagie**

Le 20 décembre 2017

**Membres du jury :**

**Rapporteurs :**

Mme Mojgan DJAVAHERI-MERGNY      Directeur de recherche INSERM, Institut Bergonié,  
Bordeaux, France

M. Jean-François PEYRON                  Directeur de recherche INSERM, Centre C3M, Nice,  
France

**Examineurs :**

Mme Danièle BENSOUSSAN              Professeur, Université de Lorraine, Nancy, France

M. Jean-Antoine RIBEIL                  Docteur, Hôpital Necker, Paris, France

M. Marc DIEDERICH                      Professeur, Université Nationale de Séoul, Corée du Sud,  
Directeur de thèse

M. Franck MORCEAU                      Docteur, LBMCC, Luxembourg, Co-directeur de thèse

**Invité :**

M. Mario DICATO                          Professeur, Centre Hospitalier de Luxembourg,  
Luxembourg

**Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC)  
Hôpital Kirchberg, 9 rue Edward Steichen, L-2540, Luxembourg**

**à Renaud**

A l'issue de la rédaction de ce manuscrit, je tiens à remercier toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à ce travail.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) à Luxembourg. Durant toute ma thèse, j'ai bénéficié d'une bourse Télévie sans laquelle ce travail n'aurait pas pu aboutir. J'exprime également toute ma reconnaissance au Professeur Mario Dicato de m'avoir permis de réaliser ce travail sous un contrat de la Fondation « Recherche Cancer et Sang » dont il est le président.

Je tiens à exprimer mes remerciements au Professeur Marc Diederich qui m'a permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions au sein du laboratoire LBMCC.

Un énorme merci au Docteur Franck Morceau qui a été un encadrant exceptionnel de part ses encouragements, sa sympathie, sa patience, ses conseils, sa disponibilité, son partage d'expérience et son aide précieuse. Qu'il trouve toute ma gratitude avec l'accomplissement de cette thèse.

Je remercie vivement le Dr Jean-Antoine Ribeil et le Pr Danièle Bensoussan d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse, d'avoir pris le temps de me suivre pendant ces trois années et de me faire l'honneur de participer au jury de soutenance. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail, vos conseils et remarques ont été d'une grande importance pour l'aboutissement de ce projet.

J'adresse également toute ma gratitude aux Dr Jean-François Peyron et Mojgdan Djavaheri-Mergny pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ma thèse.

J'adresse un merci tout particulier au personnel de la maternité de la clinique Bohler (Nelly, Zaza, Claudine, Monique, Aline, Régine... ) pour leur collaboration pendant ces trois ans ainsi que tous les couples et femmes qui ont accepté de faire don de leur sang de cordon sans quoi ce travail n'aurait pas pu être réalisé.

Je souhaite remercier le Professeur Athanase Visvikis pour son suivi et ses conseils tout au long de mon cursus à l'Université de Lorraine ainsi que pour le précieux TNF $\alpha$  qui m'a permis de réaliser ce travail.

Si j'étais un érythrocyte...

Certains seraient mon Epo, qui ont assuré ma survie, m'ont accompagné, m'ont appris, m'ont soutenu, m'ont encouragé, m'ont aidé, m'ont orienté (avec optimisme), moi petit précurseur immature, vers une belle voie de différenciation...MERCI.

D'autres seraient mon récepteur à l'Epo, qui m'ont traduit un message compliqué en un message un peu plus simple..ou pas, merci de votre patience et du temps que vous avez pris pour m'expliquer où voulaient en venir Markovnikov et Hoffman ... mais aussi pour avoir échangé mon accent « couleur locale » contre un anglais un peu mieux prononcé.

Sans oublier les copines érythrocytes toujours pleines de bonne humeur qui ont passé de longs trajets avec moi dans la circulation et au macrophage pimpant qui passait par là...pour ses conseils et ses encouragements.

Certains seraient mes transporteurs de glucose... ceux du matin... ceux de l'après-midi... qui m'ont apporté de l'énergie, des sourires, du Rock'n roll, la motivation et surtout leur soutien tout au long de ma maturation...un grand merci.

D'autres seraient des lncRNA, on ne comprend pas toujours comment ils fonctionnent, mais en plus de partager le TNF $\alpha$ , les meetings et la salle de différenciation pendant ces 3 dernières années, ils m'ont transmis leurs connaissances, leurs conseils et m'ont fait partager beaucoup de bons moments.

Un énorme merci à mon noyau, qui, même s'il est parti avant la fin de ma maturation, m'a permis d'exprimer tous mes gènes pendant de longs mails, de longues heures au téléphone, de bons repas, les chansons bizarres du vendredi, des cœurs cellulaires et des gâteaux à l'ADN...le petit poulain a bien grandi.

Sans oublier le programme U-007 de l'appareil Amara, qui m'a transfecté beaucoup de connaissances et est toujours présent et aux petits soins pour moi.

Merci également au poumon qui a su mettre du gaz dans le sang et m'a apporté de l'oxygène pour m'évader le temps de quelques journées.

Merci aux autres éléments figurés du sang qui m'ont accompagné et ont suivi le même chemin-min ainsi qu'à mes deux compères qui m'ont permis de m'échapper de la moelle osseuse en moins d'une heure.

A toi, qui m'a bombardée de particules, tu as rapidement résolu ma structure et l'a soutenue, nourrie, supportée de longues longues années et reste toujours le best, merci. Merci à l'auteur de la publication Reslinger *et al.*, qui a cru en moi et a su mettre en évidence des parties de moi qui étaient inconnues.

Merci à ma famille adoptive, les cellules endothéliales qui m'ont entouré et chouchouté pendant toute la durée de cette thèse.

Un grand merci à mes cousines, les plaquettes, qui, en plus de soigner mes blessures, m'apportent beaucoup de bonheur tous les jours ainsi qu'à leur progéniteur(-ette), pour leur gentillesse et leur patience.

D'autres seraient les cellules souches, qui m'ont donné naissance, ont créé autour de moi un environnement épanouissant et ont mis entre mes mains tous les éléments nécessaires pour l'aboutissement de cette thèse, merci. Un merci tout particulier à mon frère le LTh (Loïc T) helper pour sa gentillesse et son soutien sans failles.

A toi, mon cœur, qui me donne la force d'avancer, pour avoir partagé tous les instants de cette aventure. Merci pour tes encouragements, ta confiance et ton soutien quotidien.

Voilà tout est dit, ça y est je rougis...

**Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés**  
au « Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer »  
de la Fondation de « Recherche Cancer et Sang »  
à l'Hôpital Kirchberg, Luxembourg

**Ce travail n'aurait pu aboutir sans le soutien financier :**  
du « Télévie Luxembourg » (bourse de formation-recherche Télévie)  
de la Fondation « Recherche Cancer et Sang (FRCS) »  
de l'association « Recherches Scientifiques Luxembourg (RSL) »  
de l'association « Action Lions « Vaincre le Cancer » »  
et de l'association « Een Häerz fir Kriibskrank Kanner  
(Un cœur pour les enfants atteints d'un cancer) »

## Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Cancer et anémie inflammatoire.....</b>	<b>1</b>
1.2	<b>L'hématopoïèse.....</b>	<b>2</b>
1.2.1	Généralités.....	2
1.2.1.1	Localisation au cours du développement.....	2
1.2.1.2	Caractéristiques des cellules souches hématopoïétiques.....	3
1.2.1.3	Hématopoïèse : différents modèles.....	5
1.2.1.4	Interaction des cellules souches hématopoïétiques avec leur environnement.....	8
1.2.2	L'érythropoïèse.....	12
1.2.2.1	Modifications cellulaires au cours de l'érythropoïèse.....	12
1.2.2.2	L'hémoglobine.....	15
1.2.2.3	L'érythropoïétine.....	19
1.2.3	La granulopoïèse neutrophile.....	22
1.2.4	La monocytopoïèse.....	24
1.2.5	Réseau de régulation « facteurs de transcription/microARN ».....	24
1.2.5.1	Les facteurs de transcription.....	24
1.2.5.2	Les microARN.....	31
1.2.6	Rôle de l'autophagie.....	35
1.2.6.1	Les différents types d'autophagie.....	35
1.2.6.2	L'autophagie sélective.....	37
1.2.6.3	Les mécanismes moléculaires de l'autophagie.....	38
1.2.6.4	L'autophagie et les cellules souches hématopoïétiques.....	45
1.2.6.5	L'autophagie et la maturation érythroïde.....	46
1.2.6.6	L'autophagie et la granulopoïèse.....	46
1.2.6.7	L'autophagie et la différenciation macrophagique.....	47
1.3	<b>Le TNF<math>\alpha</math>.....</b>	<b>48</b>
1.3.1	Cytokines pro-inflammatoires et anémie.....	48
1.3.2	La superfamille du TNF.....	48
1.3.3	Le TNF $\alpha$ et les thérapies anti-TNF $\alpha$ .....	51
1.3.4	Les voies de signalisation du TNF $\alpha$ .....	53
1.3.5	Effets moléculaires du TNF $\alpha$ sur la différenciation érythroïde.....	55
1.4	<b>Les sphingolipides et la voie des céramides.....</b>	<b>56</b>
1.4.1	Structure des sphingolipides.....	56
1.4.2	Métabolisme des sphingolipides.....	58
1.4.2.1	La synthèse <i>de novo</i> des céramides.....	58
1.4.2.2	Hydrolyse par les sphingomyélinases.....	58
1.4.2.3	La voie de « sauvetage ».....	58
1.4.3	Les sphingomyélinases.....	60
1.4.3.1	Généralités.....	60
1.4.3.2	La sphingomyélinase acide.....	60
1.4.3.3	La sphingomyélinase neutre 2.....	61
1.4.4	Le rhéostat des sphingolipides.....	61
1.4.4.1	Les céramides.....	62
1.4.4.2	Les céramidases.....	62
1.4.4.3	La sphingosine kinase.....	63
1.4.4.4	La sphingosine-1-phosphate.....	63
2	<b>Objectifs.....</b>	<b>65</b>
3	<b>Matériels et méthodes.....</b>	<b>67</b>
3.1	<b>Culture cellulaire et traitements.....</b>	<b>67</b>
3.1.1	Cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques CD34 <sup>+</sup> .....	67
3.1.1.1	Isolement des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques CD34 <sup>+</sup> .....	67
3.1.1.2	Conditions de culture des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques CD34 <sup>+</sup> .....	68
3.1.1.3	Efficacité du milieu différenciant.....	68



3.1.2	Les lignées érythroleucémiques humaines.....	68
3.1.2.1	Les cellules TF-1.....	72
3.1.2.2	Les cellules K562.....	72
<b>3.2</b>	<b>Test clonogénique.....</b>	<b>72</b>
<b>3.3</b>	<b>Coloration de May-Grünwald Giemsa modifiée.....</b>	<b>73</b>
<b>3.4</b>	<b>Test de coloration à la benzidine.....</b>	<b>73</b>
<b>3.5</b>	<b>Marquage cellulaire : cytométrie et microscopie à fluorescence.....</b>	<b>74</b>
3.5.1	Marquage des céramides.....	74
3.5.2	Marquage à l'annexine V-FITC et à l'iodure de propidium.....	75
3.5.3	Cytométrie de flux.....	75
<b>3.6</b>	<b>Transfection des cellules CD34<sup>+</sup>.....</b>	<b>77</b>
<b>3.7</b>	<b>Microscopie électronique à transmission (MET).....</b>	<b>77</b>
<b>3.8</b>	<b>Extraction des protéines totales.....</b>	<b>77</b>
<b>3.9</b>	<b>Extraction des facteurs nucléaires et cytoplasmiques.....</b>	<b>78</b>
<b>3.10</b>	<b>Western Blot.....</b>	<b>78</b>
<b>3.11</b>	<b>Extraction des ARN totaux.....</b>	<b>82</b>
<b>3.12</b>	<b>Transcription inverse.....</b>	<b>82</b>
<b>3.13</b>	<b>PCR en temps réel.....</b>	<b>83</b>
<b>3.14</b>	<b>Analyses statistiques.....</b>	<b>83</b>
<b>4</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>86</b>
<b>4.1</b>	<b>Effet du TNF<math>\alpha</math> sur l'activation des sphingomyélinases.....</b>	<b>86</b>
<b>4.2</b>	<b>Effet des céramides sur l'érythropoïèse.....</b>	<b>86</b>
4.2.1	Effet des céramides de synthèse C2 sur l'expression des marqueurs érythroïdes dans les cellules CD34 <sup>+</sup> .....	86
4.2.2	Effet des céramides C2 et des dihydrocéramides C2 sur la différenciation érythroïde des cellules érythroleucémiques TF-1 et K562.....	92
4.2.3	Effet de la sphingomyélinase bactérienne de <i>S. aureus</i> sur l'érythropoïèse.....	94
4.2.4	Conclusion.....	98
<b>4.3</b>	<b>Implication des sphingomyélinases dans l'inhibition de l'érythropoïèse.....</b>	<b>99</b>
4.3.1	Dans les cellules CD34 <sup>+</sup> .....	99
4.3.2	Dans les cellules TF-1.....	99
4.3.3	Dans les cellules K562.....	103
4.3.4	Conclusion.....	105
<b>4.4</b>	<b>Effet de la sphingosine-1-phosphate sur l'érythropoïèse.....</b>	<b>106</b>
4.4.1	Conclusion.....	109
<b>4.5</b>	<b>Effet du TNF<math>\alpha</math> et des céramides sur la différenciation hématopoïétique.....</b>	<b>110</b>
4.5.1	Effet des céramides et des inhibiteurs de sphingomyélinase sur la viabilité cellulaire.....	110
4.5.2	Impact du TNF $\alpha$ , des céramides et des inhibiteurs de sphingomyélinases sur la morphologie cellulaire.....	110
4.5.3	Caractérisation des populations induites par le TNF $\alpha$ et les céramides dans les CSPH CD34 <sup>+</sup> ...113	113
4.5.4	Effet du TNF $\alpha$ sur l'expression du marqueur de différenciation granulo-monocytaire CD11b...113	113
<b>4.6</b>	<b>Effet du TNF<math>\alpha</math> et des céramides sur des facteurs de régulation communs aux voies érythroïde et myéloïde.....</b>	<b>116</b>
4.6.1	Les facteurs de transcription.....	116
4.6.2	Les microARN.....	118
4.6.3	Conclusion.....	123
<b>4.7</b>	<b>Implication de l'autophagie dans l'inhibition de l'érythropoïèse par la voie TNF<math>\alpha</math>/Sphingomyélinase neutre/ Céramide.....</b>	<b>124</b>
4.7.1	Evaluation de l'induction de l'autophagie dans les CSPH CD34 <sup>+</sup> stimulées par l'Epo.....	124
4.7.2	Etude de l'effet du TNF $\alpha$ et des céramides sur l'autophagie par microscopie électronique à transmission.....	124
4.7.3	Effet du TNF $\alpha$ sur les protéines régulatrices de l'autophagie.....	127
4.7.3.1	PI3K/AKT/mTOR/ULK1/Atg13.....	127
4.7.3.2	LC3/Atg5-12/Atg7.....	131

4.7.3.3	SQSTM1/p62.....	134
4.7.3.4	Beclin 1 et RUBICON.....	134
4.7.4	Effet du TNF $\alpha$ et des céramides sur l'expression des gènes codant les protéines de l'autophagie.....	138
4.7.5	Implication du miR-155 dans l'inhibition de l'autophagie.....	138
4.7.6	Conclusion.....	142
<b>5</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>143</b>
5.1	Choix des modèles cellulaires.....	144
5.2	La voie TNF $\alpha$ /sphingomyélinase neutre/céramides inhibe l'érythropoïèse induite par l'érythropoïétine.....	145
5.3	Les céramides et le TNF $\alpha$ induisent la granulopoïèse aux dépens de l'érythropoïèse <i>via</i> la modulation de miR et FT hématopoïétiques.....	149
5.4	Le TNF $\alpha$ et les céramides inhibent l'autophagie <i>via</i> l'activation de mTOR.....	153
	Conclusion et perspectives.....	158
<b>6</b>	<b>Bibliographie.....</b>	<b>160</b>

## Table des figures

Figure 1 : Divisions symétrique et asymétrique des CSH.....	4
Figure 2 : L'hématopoïèse (Modèle classique).....	6
Figure 3 : Différents modèles de différenciation des CSH.....	7
Figure 4 : Les niches hématopoïétiques.....	9
Figure 5 : Cytokines, facteurs de transcription et miR qui régulent l'hématopoïèse.....	11
Figure 6 : L'érythropoïèse.....	14
Figure 7 : Les différents types d'hémoglobine au cours du développement.....	17
Figure 8 : Biosynthèse de l'hème.....	18
Figure 9 : Voies de signalisation de l'érythropoïétine.....	21
Figure 10: La granulopoïèse neutrophile.....	23
Figure 11 : Etapes de la monocytopoïèse.....	25
Figure 12 : La balance GATA-1/GATA-2.....	27
Figure 13 : L'antagonisme GATA-1/PU.1.....	30
Figure 14 : Biogénèse des miR.....	33
Figure 15 : Les 3 principaux types d'autophagie.....	36
Figure 16 : Les mécanismes moléculaires de l'autophagie.....	40
Figure 17 : Convergence entre les voies de l'autophagie et de l'endocytose.....	44
Figure 18 : Cytokines pro-inflammatoires et anémie.....	50
Figure 19 : Induction de l'apoptose par Fas, TRAILR1 et TRAILR2.....	52
Figure 20 : Voies de signalisation du TNF $\alpha$ .....	54
Figure 21 : Structures chimiques des sphingolipides.....	57
Figure 22 : Voies de biosynthèse des céramides.....	59
Figure 23 : Conditions de culture et de traitement.....	69
Figure 24 : Efficacité du milieu différenciant.....	71
Figure 25 : Effet du TNF $\alpha$ sur la formation de céramides.....	87
Figure 26 : Effet des céramides C2 sur la production d'hémoglobine dans les cellules CD34 <sup>+</sup> .....	88
Figure 27 : Effet des céramides C2 sur l'expression des globines et du récepteur à l'Epo dans les cellules CD34 <sup>+</sup> .....	90

Figure 28 : Effet des céramides C2 sur l'expression de la glycophorine A dans les cellules CD34 <sup>+</sup>	91
Figure 29 : Effet des céramides C2 sur la production d'hémoglobine dans les cellules TF-1 et K562 .....	93
Figure 30 : Effet de la sphingomyélinase bactérienne de <i>S. aureus</i> sur la production d'hémoglobine dans les cellules CD34 <sup>+</sup> .....	96
Figure 31 : Effet de la sphingomyélinase bactérienne de <i>S. Aureus</i> sur la formation d'hémoglobine dans les cellules TF-1 et K562.....	97
Figure 32 : Les céramides inhibent l'expression des marqueurs érythroïdes dans les cellules CD34 <sup>+</sup> .....	98
Figure 33 : Effet des inhibiteurs des sphingomyélinases neutre et acide (GW4869 et désipramine) sur l'activité inhibitrice du TNF $\alpha$ dans les cellules CD34 <sup>+</sup> .....	100
Figure 34 : Effet des inhibiteurs des sphingomyélinases neutre et acide (GW4869 et désipramine) sur l'expression des globines dans les cellules CD34 <sup>+</sup> .....	101
Figure 35 : Effet des inhibiteurs des sphingomyélinases neutres et acides (GW4869 et désipramine) sur l'activité inhibitrice du TNF $\alpha$ dans les cellules TF-1.....	102
Figure 36 : Effet de l'inhibiteur de la sphingomyélinase neutre GW4869 sur l'activité inhibitrice du TNF $\alpha$ dans les cellules K562.....	104
Figure 37 : Le TNF $\alpha$ inhibe l'érythropoïèse <i>via</i> la voie nSMase/Céramide dans les cellules CD34 <sup>+</sup> .....	105
Figure 38 : Effet de la sphingosine-1-phosphate sur la production d'hémoglobine.....	107
Figure 39 : Effet du TNF $\alpha$ sur l'expression de la sphingosine kinase.....	108
Figure 40 : Le TNF $\alpha$ inhibe l'expression de la sphingosine kinase.....	109
Figure 41 : Effet des différents traitements sur la viabilité cellulaire.....	111
Figure 42 : Effet des céramides et des inhibiteurs de sphingomyélinases sur l'évolution morphologique des cellules CD34 <sup>+</sup> .....	112
Figure 43 : Effet du TNF $\alpha$ et des céramides sur la formation de colonies hématopoïétiques en présence d'Epo.....	114
Figure 44 : Effet du TNF $\alpha$ sur l'expression du marqueur CD11b dans les cellules CD34 <sup>+</sup> .....	115
Figure 45 : Effet des céramides sur l'expression des facteurs de transcription hématopoïétiques GATA-1, GATA-2 et PU.1.....	117
Figure 46 : Effet du TNF $\alpha$ et des céramides sur l'expression des miR-144, -451 et -146a.....	119
Figure 47 : Effet du TNF $\alpha$ sur l'expression des miR-155 et -223.....	120
Figure 48 : Expression des miR modulés par le TNF $\alpha$ à 24h.....	121
Figure 49 : Expression des miR modulés par l'Epo.....	122

Figure 50 : La voie TNF $\alpha$ /nSMase/Ceramide est impliquée dans l'inhibition de l'érythropoïèse et l'induction de la granulopoïèse.....	123
Figure 51 : Effet de l'Epo sur la conversion de la protéine LC3.....	125
Figure 52 : Effet du TNF $\alpha$ et des céramides sur l'autophagie.....	126
Figure 53 : Effet du TNF $\alpha$ et des céramides sur la phosphorylation de PI3K, AKT, mTOR, ULK1 et Atg13 à 4 jours.....	128
Figure 54 : Effet du TNF $\alpha$ sur la voie PI3K/AKT/mTOR/ULK/Atg13 à 24h.....	129
Figure 55 : Effet de la rapamycine sur la production d'hémoglobine.....	130
Figure 56 : Effet du TNF $\alpha$ et des céramides sur la répartition cellulaire de LC3.....	132
Figure 57 : Effet du TNF $\alpha$ et du GW4869 sur la conversion de LC3.....	133
Figure 58 : Effet du TNF $\alpha$ et des céramides sur la formation du complexe Atg5-Atg12 et l'expression d'Atg7.....	135
Figure 59 : Effet du TNF $\alpha$ et des céramides sur l'expression de p62.....	136
Figure 60 : Effet du TNF $\alpha$ sur l'expression des protéines beclin 1 et RUBICON.....	137
Figure 61 : Effet du TNF $\alpha$ et des céramides sur l'expression des gènes codant les protéines de l'autophagie.....	139
Figure 62 : Effet d'un analogue du miR-155 sur ses cibles impliquées dans l'autophagie.....	141
Figure 63 : Effet du TNF $\alpha$ et des céramides sur l'autophagie.....	142
Figure 64 : Conclusion générale.....	159

## Table des tableaux

Tableau 1 : Composition des milieux de culture des cellules CD34 <sup>+</sup> .....	70
Tableau 2 : Conditions d'utilisation des anticorps pour le marquage des céramides.....	74
Tableau 3 : Conditions d'utilisation des anticorps en cytométrie de flux.....	76
Tableau 4 : Composition des tampons pour l'extraction des facteurs nucléaires et cytoplasmiques.	79
Tableau 5 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les Western Blot.....	80
Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR en temps réel.....	84
Tableau 7 : Séquences des miR analysés par PCR en temps réel.....	85

## **Production scientifique**

### **ARTICLES**

#### **Annexe 1**

Trécul A, Morceau F, Gaigneaux A, **Orsini M**, Chateauvieux S, Grandjenette C, Dicato M, Diederich M.

Polyphenol tri-vanillic ester 13c inhibits P-JAK2V617F and Bcr-Abl oncokinase expression in correlation with STAT3/STAT5 inactivation and apoptosis induction in human leukemia cells, Cancer Letters (2013), 340(1):30-42.

### **REVUES**

#### **Annexe 2**

Morceau F, Chateauvieux S, **Orsini M**, Trécul A, Dicato M, Diederich M.

Natural compounds and pharmaceuticals reprogram leukemia cell differentiation pathways, Biotechnology Advances (2015), 33(6 Pt 1):785-97.

## Abréviations

Acla : Aclacinomycine A

ADAM17 : *a Disintegrin and metalloproteinase 17*

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AHSP : *α-Hemoglobin stabilizing protein*

ALA : Acide aminolévulinique

ALAD : Acide aminolévulinique déshydratase

ALAS : Acide aminolévulinique synthase

AMP : Adénosine monophosphate

AMPK : *5'-Adenosine monophosphate-activated protein kinase*

Ang-1 : Angiopoïétine 1

ARD-1 : *Arrest-defective 1*

ARNm : Acide ribonucléique messenger

aSMase : Sphingomyélinase acide

Atg : *Autophagy-related gene*

Atg14L : *Autophagy-related gene 14 like*

ATP : Adénosine tri-phosphate

ATRA : *All trans retinoic acid*

Bala-CSH : *Balanced-CSH*

Bcl-xL : *B-cell lymphoma-extra large*

bSMase : Sphingomyélinase bactérienne

BTG1 : *B cell translocation gene 1*

C1P : Céramide-1-phosphate

C2-cer : Céramide C2

CAPK : *Ceramide-activated protein kinase*

CAPP : *Ceramide-activated protein phosphatase*

CAR : *CXCL12 abundant reticular*



CaR : *Calcium-sensing receptor*

CBP : *CREB-binding protein*

CD : Cluster de différenciation

CDase : Céramidase

C/EBP : *CCAAT-enhancer binding protein 1*

CerK : Céramide kinase

CERT : *Ceramide transport protein*

CerS : Céramide synthase

CFU-Baso : *Colony forming units-Basophile*

CFU-E : *Colony forming units-Erythroïde*

CFU-Eo : *Colony forming units-Eosinophile*

CFU-G : *Colony forming units-Granulocyte*

CFU-GEMM : *Colony forming units-Granulocyte/Erythrocyte/Macrophage/Mégacaryocyte*

CFU-GM : *Colony forming units-Granulocyte/Monocyte*

CFU-M : *Colony forming units-Monocyte*

CFU-Meg : *Colony forming units-Mégacaryocyte*

CKI : *Cyclin-dependant kinase inhibitor*

CMA : *Chaperone-mediated autophagy*

CoA : Coenzyme A

CPO : Coprogène oxydase

CPP : Céramide-1-phosphate phosphatase

CPTP : *C-1-P specific transfer protein*

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

CSM : Cellules souches mésenchymateuses

CSPH : Cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques

CXCL12 : *C-X-C motif chemokine 12*

CXCR4 : *C-X-C chemokine receptor 4*

DD : *Death domain*

DDDO : Domaine de dégradation dépendant de l'oxygène

Deptor : *DEP-domain containing mTOR interacting protein*

Des : Désipramine

DES : Dihydrocéramide désaturase

DGCR8 : *DiGeorge syndrome chromosomal region 8*

DH : Dihydrocéramides C2

DISC : *Death-inducing signaling complex*

dNTP : Désoxynucléotide triphosphate

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPBS : *Dulbecco's phosphate buffered saline*

DR : *Death receptor*

DTT : Dithiothréitol

EBF : *Early B-cell factor 1*

EDAR : *Ectodysplasin A receptor*

EDTA : Ethyldiamine tétraacétate

EDRF : *Erythroid differentiation-related factor*

EGTA : *Ethylene glycol tetraacetic acid*

EKLF : *Erythroïd Kruppel-like factor*

Emp : *Erythroblast macrophage protein*

Epo : Erythropoïétine

EpoR : *Erythropoietin receptor*

ERAF : *Erythroid-associated factor*

ERK : *Extracellular signal-regulated kinase*

ESA : *Erythropoiesis-stimulating agent*

ESCRT : *Endosomal sorting complex required for transport*

Ets : *E26-transformation specific*

FADD : *Fas-associated death domain*

FAN : *Factor associated with nSMase activation*

FIH-1 : Facteur inhibiteur de HIF-1

FIP200 : *FAK family-interacting protein 200*

Fli-1 : *Friend leukemia integration 1*

FLIP : *FLICE-inhibitory protein*

Flt3 : *Fms-like tyrosine kinase 3*

Flt3L : *Fms-like tyrosine kinase 3 ligand*

FOG-1 : *Friend of GATA 1*

FOXO3 : *Forkheadbox O3*

FT : Facteur de transcription

GABARAP : *Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*

GABARAPL1 : *Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein like 1*

GABARAPL2 : *Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein like 2*

GABP $\alpha$  : *GA-binding protein alpha*

GATE-16 : *Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa*

GCCase : Glucosylcéramidase

GCS : Glucosylcéramide synthase

G-CSF : *Granulocyte - colony stimulating factor*

Gfi-1 : *Growth factor independent 1*

GFP : *Green fluorescent protein*

GM-CSF : *Granulocyte macrophage - colony stimulating factor*

GPA : Glycophorine A

Grb2 : *Growth factor receptor-bound protein 2*

GvH : *Greffon versus hôte*

Hb : Hémoglobine

HbA : Hémoglobine adulte

HbF : Hémoglobine foétale

HEPES : *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid*

HIAC : *Hematopoietic intraaortic clusters*

HIF : *Hypoxia inducible factor*

HMBA : Hexaméthylène bisacétamide

HMBS : Hydroxyméthylbilane synthase

HRE : *Hypoxia response element*

HRP : *Horseradish peroxydase*

HS : *Hypersensitive site*

Hsc70 : *Heat shock cognate protein 70*

Hsp70 : *Heat shock protein 70*

IFN $\gamma$  : Interféron gamma

IgG : Immunoglobuline G

IKK : I $\kappa$ B kinase

IL : Interleukine

ILV : *Intraluminal vesicle*

IRAK : *Interleukine 1 receptor-associated kinase*

IRF8 : *Interferon regulatory factor-8*

IT-CSH : *Intermediate-CSH*

JAK2 : Janus kinase 2

JNK : *c-jun N-terminal kinase*

Klf1 : *Krüppel-like factor 1*

KSR : *Kinase suppressor of Ras*

LAMP1 : *Lysosome-associated membrane protein 1*

LAMP2A : *Lysosome-associated membrane protein 2A*

LB : Lymphocyte B

LC3 : *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*

LCR : *Locus control region*

Ldb1 : *LIM domain binding protein 1*

LIR: *LC3-interacting region*

LMA : Leucémie myéloïde aigüe

Lmo-2 : *LIM only protein 2*

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocyte T

LT-CSH : *Long term-CSH*

Ly-bi CSH : *Lymphoid-biased CSH*

3-MA : 3-Méthyladénine

MACS : *Magnetic cell sorting*

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*

MA-SMase : *Mitochondria-associated sphingomyelinase*

MB : Myéloïde-B

M-CSF : *Macrophage - colony stimulating factor*

MEK : MAPK ERK kinase

MET : Microscopie électronique à transmission

MGG : May-Grünwald Giemsa

miR : MicroARN

mLST8 : *Mammalian lethal with SEC13 protein 8*

MPER : *Mammalian protein extraction reagent*

Mpl : *Myeloproliferative leukemia protein*

MRE : *Major regulatory element*

MT : Myéloïde-T

mTOR : *Mammalian target of rapamycin*

mTORC : *Mammalian target of rapamycin complex*

MVB : *Multivesicular bodie*

My-bi CSH : *Myeloid-biased CSH*

nCDase : Céramidase neutre

NF-E2 : *Nuclear factor-erythroid 2*

NF-κB : *Nuclear factor- kappa B*

NK : *Natural killer*

NSD : *nSMase activating domain*

nSMase : *Neutral sphingomyelinase*

NT : Non traduite

Osteomac : *Osteoblast-supportive endosteal macrophage*

PAS : *Pre-autophagosomal structure*

PBG : Porphobilinogène

PBGD : Porphobilinogène désaminase

PBS : *Phosphate buffered saline*

PBS-T : *Phosphate buffered saline-Tween*

PCR : *Polymerase chain reaction*

PE : Phosphatidyléthanolamine

PFA : Paraformaldéhyde

PGM : Progéniteur granulocyte/macrophage

PHD : Prolyl-4-hydroxylase

PI : Phosphatidylinositol

PI3K : Phosphoinositide-3-kinase

PI3P : Phosphatidylinositol-3-P

PKB/AKT : Protéine kinase B

PKC : Protéine kinase C

PLC : Progéniteur lymphoïde commun

PMC : Progéniteur myéloïde commun

PME : Progéniteur mégacaryocyte/érythrocyte

PMLC : Progéniteur myélo-lymphoïde commun

PMP : Progéniteur multipotent

PMSF : *Phenylmethylsulfonyl fluoride*

PNN : Polynucléaire neutrophile

PP1 : Protéine phosphatase 1

PP2A : Protéine phosphatase 2A

PPLM : Premier progéniteur lymphoïde-myéloïde

PPO : Protogène oxydase

PRAS40 : *Proline-rich Akt substrate*

Pré-B : Pré-lymphocyte B

Pré-NK : Pré-Natural killer

Pré-T : Pré-lymphocyte T

Pro-B : Pro-lymphocyte B

Pro-T : Pro-lymphocyte T

PVDF : Polyvinylidène difluoride

pVHL : *Von Hippel-Lindau protein*

RE : Réticulum endoplasmique

rhEpo : *Recombinant human erythropoietin*

RIP-1 : *Receptor interacting protein 1*

RIPK : *Receptor interacting protein kinase*

RISC : *RNA-induced silencing complex*

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute*

Rubicon : *RUN domain protein as Beclin1 interacting and cystein rich containing*

RUNX1 : *Runt-related transcription factor 1*

SAB : Sérum albumine bovine

SAR : *Selective autophagy receptor*

S1P : Sphingosine-1-phosphate

S1PR : *Sphingosine-1-phosphate receptor*

SCF : *Stem cell factor*

Scl : *Stem cell leukemia*

SCO : Sang de cordon ombilical

SDF-1 : *Stromal cell-derived factor 1*

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*

SMase : Sphingomyélinase

SMS : Sphingomyéline synthase

SNARE : *Soluble ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*

SNS : Système nerveux sympathique

SphK : Sphingosine kinase

SPP : Sphingosine phosphate phosphatase

SPT : Sérine palmitoyltransférase

SQSTM1 : Sequestosome 1

STAT : *Signal transducer and activator of transcription*

ST-CSH : *Short term-CSH*

SVF : Sérum de veau foetal

sTNF $\alpha$  : *soluble TNF $\alpha$*

TACE : *TNF $\alpha$ -converting enzyme*

TAL1 : *T-cell acute lymphoblastic leukemia 1*

TCF-1 : *T-cell specific transcription factor 1*

TGF $\beta$  : *Transforming growth factor  $\beta$*

TLR : *Toll-like receptor*

tmTNF $\alpha$  : *Transmembrane TNF $\alpha$*

TNF $\alpha$  : *Tumor necrosis factor alpha*

TNF-R : *Tumor necrosis factor receptor*

TPO : Thrombopoïétine

TRADD : *TNF-R1 associated death domain protein*

TRAF : *TNF receptor-associated factor*

TRAIL : *TNF-related apoptosis inducing ligand*

TRAILR : *TNF-related apoptosis inducing ligand receptor*

TRBP : *TAR RNA binding protein*

t-SNARE : *Target-associated membrane SNARE*

ULK1 : *UNC-51 like kinase*

UROD : Urogène décarboxylase

UROS : Urogène synthase

UVRAG : *UV radiation resistance-associated gene*

VAMP : *Vesicle-associated membrane protein*



*v-ATPase : Vacuolar-ATPase*

*VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule-1*

*VMP1 : Vacuole membrane protein 1*

*Vps : Vacuolar protein sorting*

*v-SNARE : Vesicular-associated membrane SNARE*

*WIPI : WD-repeat protein interactin with phosphoinositides*

*XBP1 : X-box binding protein 1*

# 1 Introduction

## 1.1 Cancer et anémie inflammatoire

L'anémie est caractérisée par une diminution du nombre de globules rouges ou de la concentration d'hémoglobine (Hb) qu'ils contiennent. C'est un symptôme qui touche environ 39% des patients atteints d'un cancer mais ce taux peut varier en fonction du type de cancer, du stade de la maladie et des traitements (Birgegard *et al.*, 2005). L'anémie est considérée comme un facteur aggravant car elle diminue considérablement la qualité et l'espérance de vie des malades ainsi que leur réponse aux traitements. De plus, l'état d'hypoxie liée à l'anémie conduit à une induction de la transcription du facteur d'hypoxie HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia inducible factor 1)(Aebersold *et al.*, 2001) rendant le cancer plus agressif et plus résistant aux traitements. En effet, les conditions d'hypoxie entraînent un phénomène d'angiogenèse tumorale, la formation de métastases ainsi qu'une induction de la prolifération et une instabilité génétique des cellules tumorales (Gonzalez *et al.*, 2011). Actuellement les traitements symptomatiques de l'anémie liée au cancer sont essentiellement les transfusions sanguines et les agents stimulant l'érythropoïèse (ESA pour erythropoiesis-stimulating agent) qui permettent une augmentation de la production de globules rouges. Cependant, bien que les ESA permettent de diminuer la transfusion des patients et les risques associés (Littlewood *et al.*, 2001), l'utilisation de ces derniers est déconseillée dans certains cas et doit prendre en compte le rapport bénéfice/risque (Dicato *et al.*, 2010, Apro *et al.*, 2012). En effet, de nombreux essais cliniques sur différents types de cancers ont montré que les ESA augmentent la mortalité liée aux risques thromboemboliques et dans certains cas à l'activation de la progression tumorale (Bennett *et al.*, 2008, Bohlius *et al.*, 2009, Glaspy *et al.*, 2010, Leyland-Jones *et al.*, 2016). Les causes de l'anémie liée au cancer sont nombreuses. En effet, l'anémie tend à s'aggraver après une chimiothérapie ou une radiothérapie mais la tumeur elle-même peut en être la cause. De plus, des lésions rénales dues à la chimiothérapie, à une invasion tumorale ou à l'âge, affectent la capacité de production de l'érythropoïétine (Epo) par le rein, conduisant ou contribuant au développement d'anémie chez ces patients. Des contraintes mécaniques dues à la croissance de la tumeur peuvent conduire à une destruction des cellules sanguines ou de leurs précurseurs dans la moelle osseuse et à des hémorragies. Enfin, l'activation du système immunitaire, se traduisant notamment par des réactions inflammatoires chroniques, est à l'origine d'un déficit en globules rouges (Spivak, 2005, Gilreath *et al.*, 2014). La production importante de cytokines pro-inflammatoires, comme le

Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ) peut en effet, affecter le système hématopoïétique et particulièrement la différenciation érythroïde qui est une branche de l'hématopoïèse (Johnson *et al.*, 1989).

## **1.2 L'hématopoïèse**

L'hématopoïèse est le processus physiologique de formation et de renouvellement des cellules sanguines. Les différentes cellules hématopoïétiques sont générées à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH) multipotentes.

### **1.2.1 Généralités**

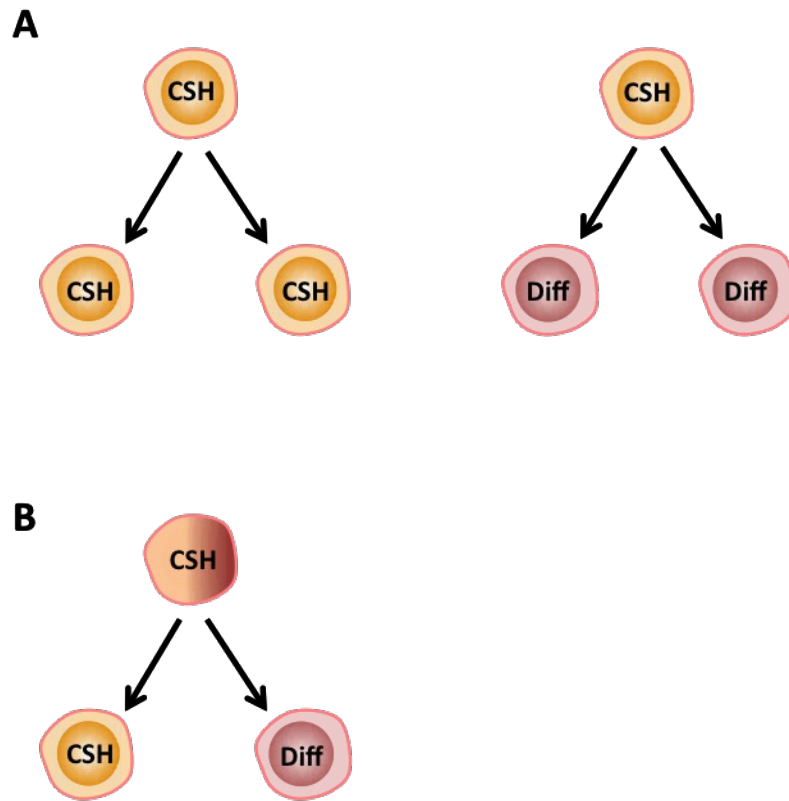
#### **1.2.1.1 Localisation au cours du développement**

Le système hématopoïétique se met en place dès les premières semaines du développement embryonnaire. Dans un premier temps, un précurseur bipotent dérivé du mésoderme, appelé hémangioblaste, serait capable de donner naissance aux cellules endothéliales ainsi qu'aux CSH primitives regroupées en îlots sanguins dans le sac vitellin (phase mégakaryoblastique). Ces cellules conduisent notamment à la formation d'érythrocytes primitifs transitoires, nucléés et produisant de l'Hb fœtale (Cumano *et al.*, 2007). Puis, une deuxième vague prend place au moment de la mise en place de la circulation sanguine chez l'embryon, au niveau de l'aorte dorsale et du placenta pour générer, à partir des cellules endothéliales hématogènes, des CSH immatures ou pré-CSH regroupées en clusters appelés Hematopoietic Intraaortic Clusters (HIAC) (Golub *et al.*, 2013). Pour que l'hématopoïèse définitive soit achevée, les CSH doivent coloniser le foie et la rate pour leur expansion et leur maturation (phase hépatosplénique) chez le fœtus. Enfin, les cellules vont coloniser la moelle osseuse (phase myéloïde) à partir de la dixième semaine de vie embryonnaire formant ainsi la moelle rouge qui sera le siège définitif de l'hématopoïèse. Ces migrations jusqu'aux niches hématopoïétiques nécessitent des molécules chimiotactiques telles que le stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) appelé aussi C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12) qui se lie au récepteur C-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4) présent à la surface des CSH (Ciriza *et al.*, 2013). A la naissance, la moelle osseuse est quasi-exclusivement rouge, puis est convertie progressivement en moelle jaune (tissu adipeux). Chez l'adulte, les sites de l'hématopoïèse se limitent aux os iliaques, l'os sternal, à la tête fémorale et au sacrum.

### 1.2.1.2 Caractéristiques des cellules souches hématopoïétiques

Les CSH sont capables d'auto-renouvellement, permettant de maintenir une réserve de cellules souches indifférenciées ou au contraire de générer des cellules capables de se différencier pour donner naissance aux différentes cellules du sang en fonction des besoins de l'organisme. Les CSH peuvent produire deux cellules filles par division symétrique ou asymétrique. La division symétrique va conduire soit à la production de deux cellules filles identiques à la cellule mère avec un potentiel d'auto-renouvellement, soit à deux cellules filles qui vont se différencier conduisant donc à une extinction clonale (Figure 1A). Lors de la division asymétrique, la cellule mère est polarisée avant la division permettant la formation d'une cellule identique à la cellule mère et d'une cellule destinée à rentrer dans un processus de différenciation (Pina *et al.*, 2007) (Figure 1B). Les causes qui conduisent une CSH à se différencier ou au contraire à conserver sa capacité d'auto-renouvellement ne sont pas encore élucidées. Deux modèles ont été proposés. Le modèle stochastique ou probabiliste pour lequel la destinée de la CSH est un phénomène aléatoire indépendant du milieu extracellulaire et des cytokines, qui ne joueraient un rôle que dans la prolifération et la survie des cellules. Dans le deuxième modèle, dit modèle déterministe, l'engagement des cellules serait dû à des signaux extracellulaires impliquant l'environnement des CSH (Wagers *et al.*, 2002).

Contrairement à ce qui a longtemps été envisagé, les CSH constituent une population hétérogène. En effet, l'étude de la capacité et de la vitesse de reconstitution hématopoïétique suite à la transplantation d'une seule CSH chez un hôte irradié a révélé différents types de cellules souches. Il a été observé que certains clones se différencient préférentiellement vers la voie lymphoïde alors que d'autres reconstituent des cellules myéloïdes. Ces CSH « biaisées » sont nommées cellules  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ou  $\delta$  par l'équipe de Connie Eaves (Benz *et al.*, 2012) alors que Muller-Sieburg *et al.*, adoptent une autre nomenclature : les myeloid-biased CSH (My-bi CSH) correspondent aux cellules  $\alpha$ , les lymphoid-biased CSH (Ly-bi CSH) correspondent aux cellules  $\beta$  et les balanced CSH (Bala-CSH) qui ont un ratio myeloïde/lymphoïde équilibré correspondent aux cellules  $\gamma/\delta$  (Muller-Sieburg *et al.*, 2002). Ces différents sous-types de CSH sont associés à leur capacité de reconstitution. Ema H *et al.*, associent ces sous-types aux long term-CSH (LT-CSH), les short term-CSH (ST-CSH) et les intermediate-CSH (IT-CSH) qui diffèrent par leur capacité d'auto-renouvellement et par les marqueurs moléculaires présents à leur surface (Ema *et al.*, 2014).



**Figure 1 : Divisions symétrique et asymétrique des CSH**

**A.** Division symétrique. Permet la formation de deux CSH filles identiques à la cellule mère ou de deux cellules différenciées.

**B.** Division asymétrique. La CSH mère est polarisée et donne naissance à une CSH et à une cellule différenciée.

CSH : Cellule souche hématopoïétique, Diff : Cellule différenciée

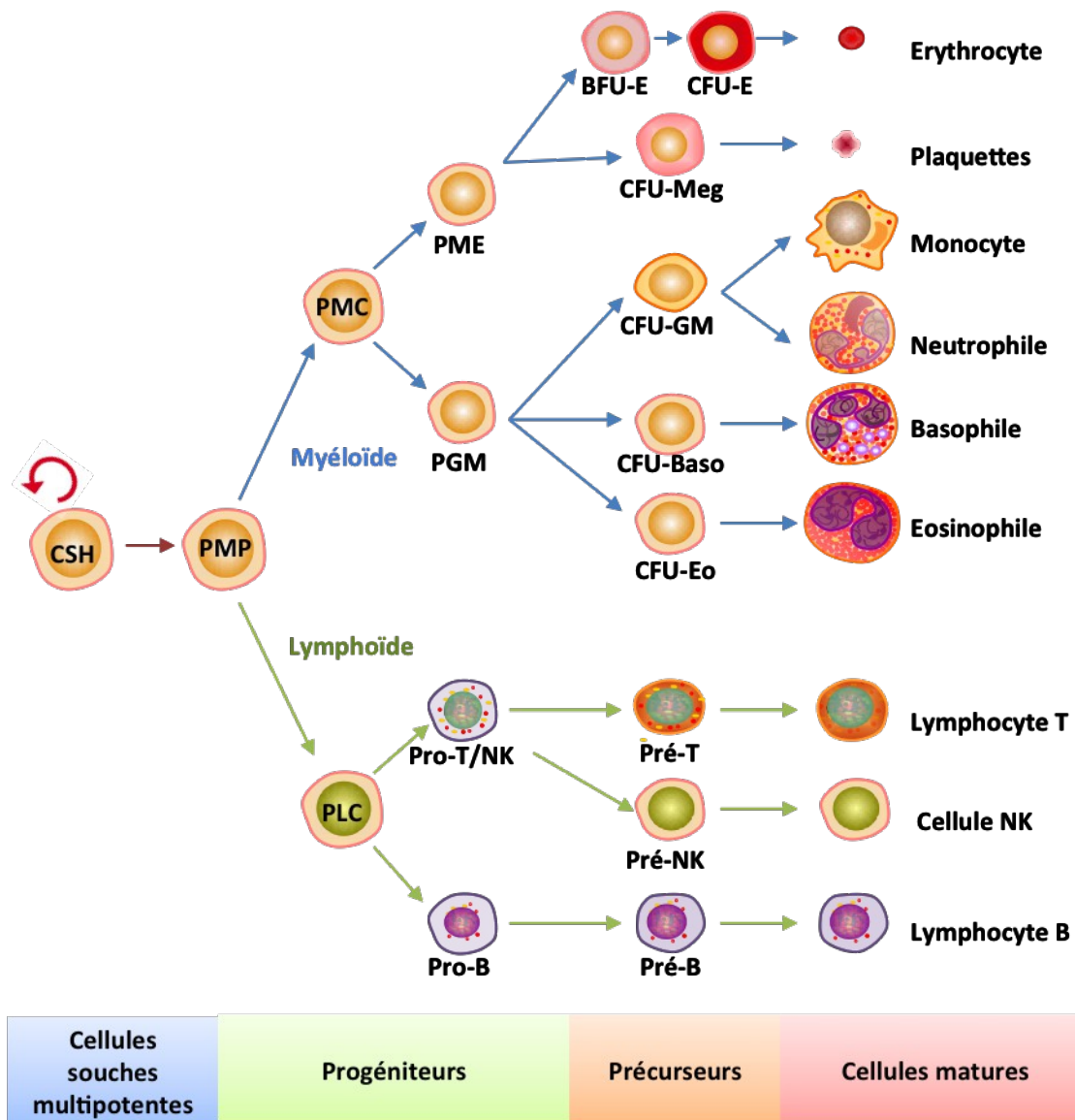
Adapté de (Pina *et al.*, 2007)

Les LT-CSH, considérées comme les « vraies CSH » sont des cellules peu abondantes mais qui ont la capacité de s'auto-renouveler pendant toute la vie de l'organisme. Les LT-CSH se développent en ST-CSH qui sont plus abondantes mais dont les propriétés d'auto-renouvellement sont plus limitées (Sharpless *et al.*, 2007). Elles expriment fortement le marqueur de surface Cluster de différenciation 34 (CD34) qui est une glycoprotéine transmembranaire caractéristique des CSH. Ce marqueur spécifique permet d'isoler les ST-CSH à partir de la moelle osseuse, du sang périphérique et du sang de cordon ombilical (SCO). A leur tour, les ST-CSH se différencient en progéniteurs multipotents (PMP) qui perdent alors la capacité d'auto-renouvellement mais possèdent une importante capacité de prolifération et de différenciation.

### 1.2.1.3 Hématopoïèse : différents modèles

Les processus de différenciation hématopoïétique sont globalement bien décrits mais les étapes initiales concernant la manière dont les CSH se différencient pour donner les différentes cellules n'ont pas encore été clarifiées. Il existe de nombreux modèles « hiérarchiques » différents :

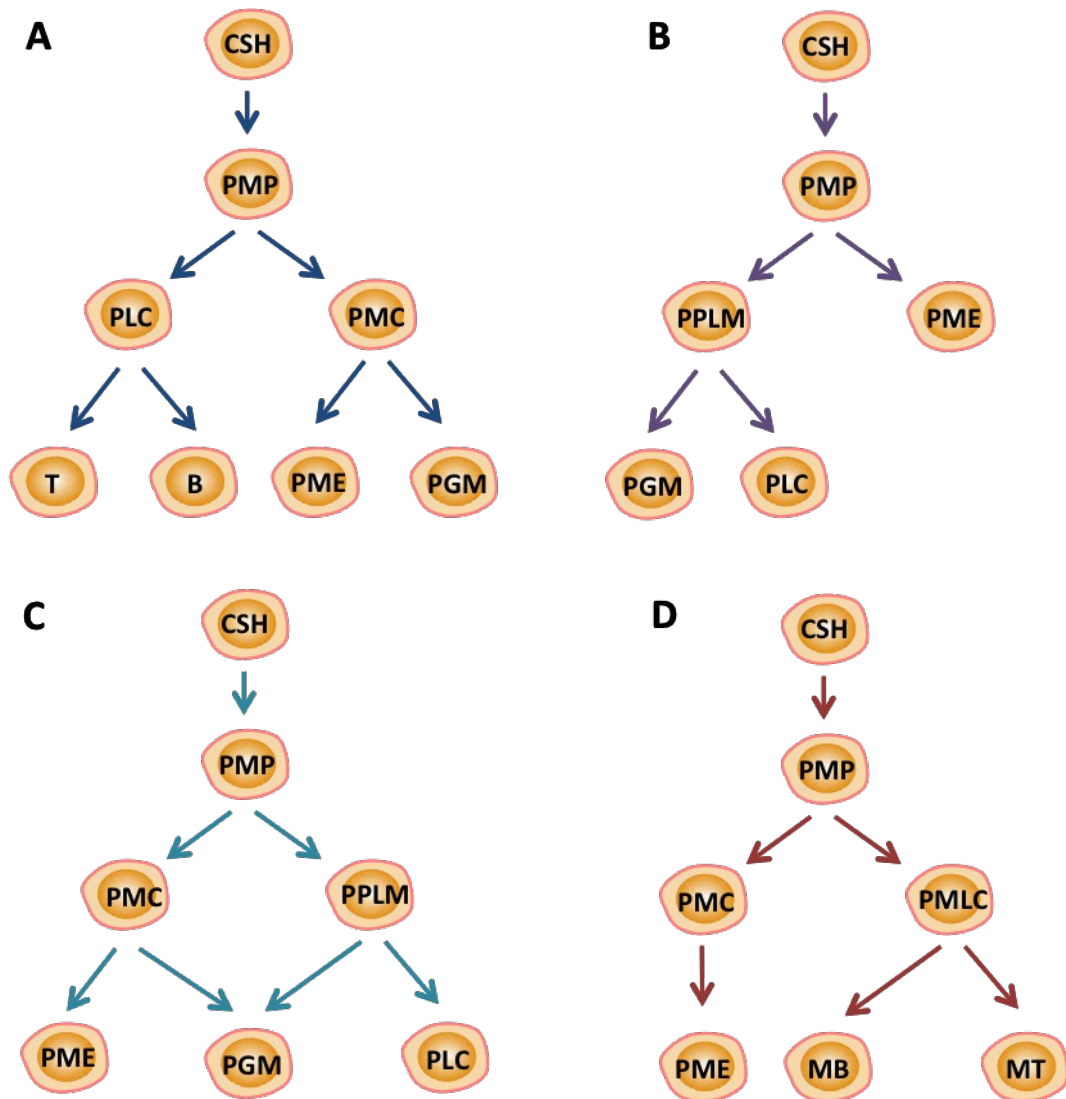
- Dans le modèle classique, appelé aussi modèle de Weissman (Figure 2 et 3A), les progéniteurs multipotents (PMP) vont s'engager vers la voie lymphoïde ou myéloïde pour générer les cellules du sang. Les progéniteurs lymphoïdes communs (PLC) sont à l'origine des Pro-lymphocytes B et T (Pro-B et Pro-T) qui se différencient en précurseurs immatures Pré-B, Pré-T et Pré-NK (Pré-lymphocyte-B, -T, Pré-Natural killer) puis en lymphocytes T, B (LT, LB) et Natural killer (NK) matures présents dans la circulation sanguine. Les érythrocytes, les plaquettes, les monocytes et les granulocytes proviennent des progéniteurs myéloïdes communs (PMC). Les PMC donnent naissance aux progéniteurs mégacaryocyte/érythrocyte (PME) et aux progéniteurs granulocyte/monocyte (PGM) plus spécialisés. Les PME et PMG se différencient en précurseurs sous forme de Colony forming units (CFU) (Akashi *et al.*, 2000) (Figure 2).
- Le second modèle, appelé modèle alternatif ou modèle PPLM (Premier progéniteur lymphoïde-myéloïde) (Figure 3B) est basé sur l'analyse du récepteur Flt3 (Fms-like tyrosine kinase 3) ou CD135 et propose l'existence d'un progéniteur commun aux voies lymphoïde et granulo-monocytaire, le PPLM. Ce progéniteur commun donnerait



**Figure 2 : L'hématopoïèse (Modèle classique)**

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) génèrent des progéniteurs multipotents (PMP) qui s'engagent dans la voie myéloïde ou lymphoïde pour donner les progéniteurs myéloïdes communs (PMC) ou les progéniteurs lymphoïdes communs (PLC) à l'origine de toutes les cellules du sang.

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



**Figure 3 : Différents modèles de différenciation des CSH**

**A.** Modèle classique ou modèle de Weissman

**B.** Modèle alternatif ou modèle PPLM

**C.** Modèle composé

**D.** Modèle myéloïde

CSH : Cellule souche hématopoïétique, PMP : Progéniteur multipotent, PLC : Progéniteur lymphoïde commun, PMC : Progéniteur myéloïde commun, T : Cellules T, B : Cellules B, PME : Progéniteur mégacaryocyte/érythrocyte, PGM : Progéniteur granulocyte/macrophage, PPLM : Premier progéniteur lymphoïde-myéloïde, PMLC : Progéniteur myélo-lymphoïde commun, MB : Myéloïde-B, MT : Myéloïde-T. Adapté de (Murre, 2007)



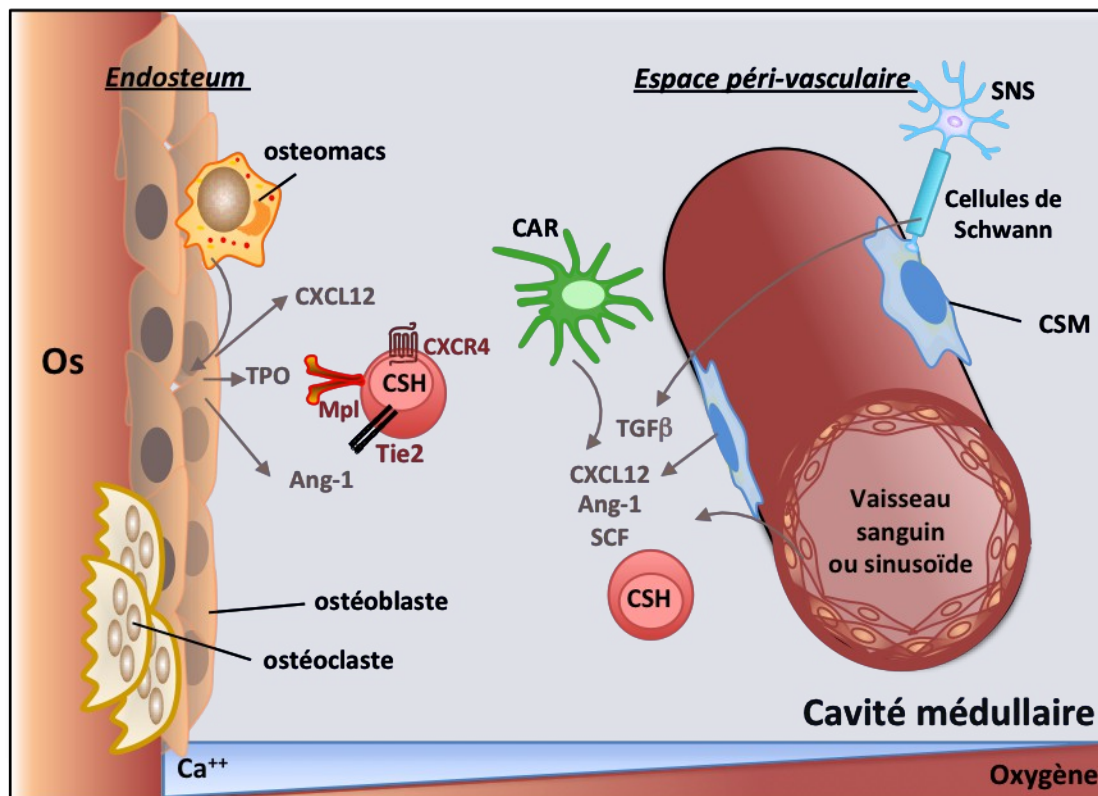
naissance aux PGM et aux PLC mais serait incapable de se différencier vers les voies érythroïde et mégacaryocytaire qui sont issues du PME (Adolfsson *et al.*, 2005).

- Un troisième modèle, le modèle composé (Figure 3C) est basé sur l'étude des facteurs de transcription (FT) essentiels à l'hématopoïèse, les facteurs GATA-1 et PU.1. Il suggère que les PGM peuvent être obtenus à partir des PPLM mais aussi des PMC.
- Un modèle proposé par Kawamoto (Kawamoto *et al.*, 2010), le modèle myéloïde (Figure 3D), suggère que le potentiel myéloïde reste présent dans les voies érythroïdes mais aussi dans les voies conduisant à la formation des lymphocytes T et B.

#### **1.2.1.4 Interaction des cellules souches hématopoïétiques avec leur environnement**

##### Maintien des cellules souches hématopoïétiques dans la niche

L'environnement dans lequel évoluent les CSH joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du système hématopoïétique en instaurant une balance entre l'auto-renouvellement, la prolifération et la différenciation des CSH. Les niches hématopoïétiques désignent des localisations anatomiques spécifiques où se trouvent les CSH ainsi que le microenvironnement qui interagit avec ces cellules. Chez l'adulte, les CSH résident essentiellement dans la moelle osseuse qui est un organe complexe contenant de nombreux types cellulaires de nature hématopoïétique ou non-hématopoïétique. Malgré l'hypothèse d'une niche unique, deux types de niches seraient présents au sein de la moelle osseuse (Figure 4). Elles varient par leur localisation au sein de l'os, les cellules qu'elles contiennent et leur rôle dans le développement hématopoïétique (Morrison *et al.*, 2014). La niche endostéale ou ostéoblastique est située à l'interface entre l'os trabéculaire et la cavité médullaire appelé endosteum. Les ostéoblastes présents au niveau de l'endosteum permettent la rétention et l'auto-renouvellement des CSH en sécrétant des chimiokines comme CXCL12 qui reconnaissent les récepteurs CXCR4 présents à la surface des CSH et favorisent l'activation de molécules d'adhésion (Petit *et al.*, 2002). Les ostéoblastes sécrètent ces chimiokines après stimulation par des macrophages appelés osteomacs (osteoblast-supportive endosteal macrophage) (Winkler *et al.*, 2010). De plus, au niveau de l'endosteum, les ostéoclastes sécrètent du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) créant un gradient de concentration au sein de la cavité médullaire. Il va aussi jouer un rôle important dans la rétention des CSH au niveau de la niche endostéale. En effet, les CSH possèdent des « Calcium-sensing receptor » (CaR), récepteurs couplés aux protéines G qui régulent l'expression de molécules d'adhésion. Adams *et al.*, ont montré que des CSH  $\text{CaR}^{-/-}$  se désolidarisent de la niche endostéale et



**Figure 4 : Les niches hématopoïétiques**

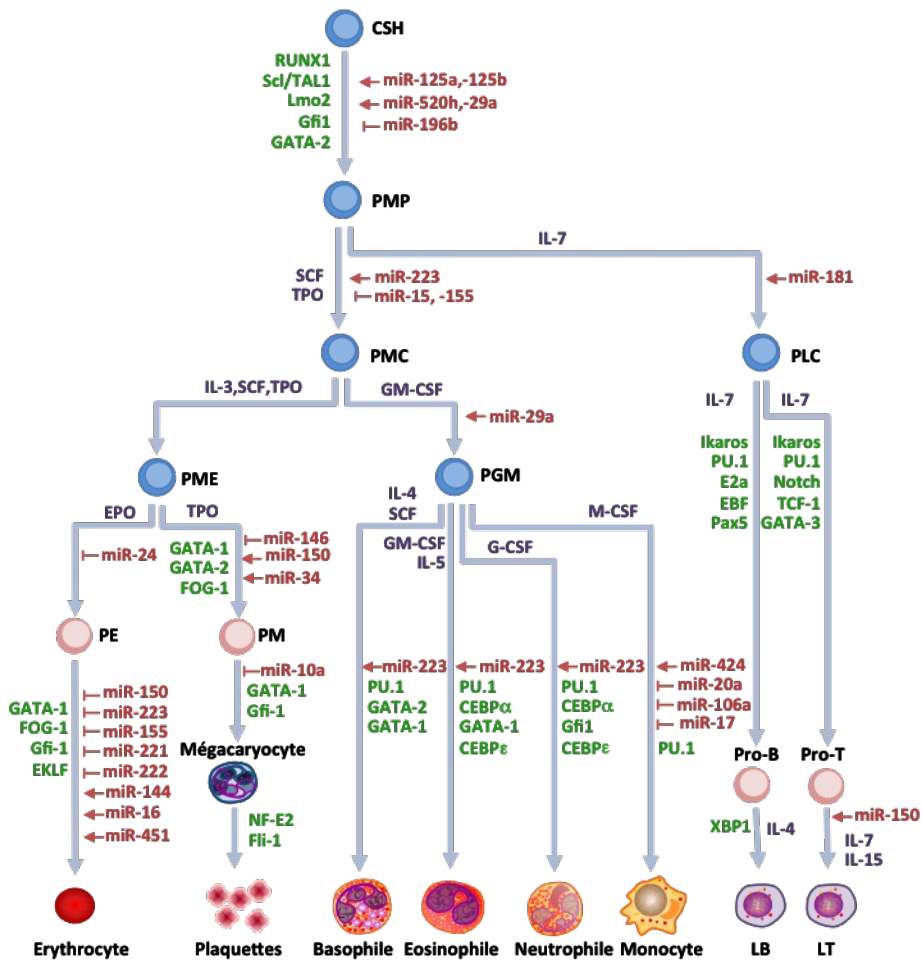
Les CSH sont retrouvées dans la moelle osseuse principalement à proximité de l'endosteum et des vaisseaux sanguins. Les différents types cellulaires présents au niveau des niches endostéale et péri-vasculaire comme les ostéoblastes, les macrophages, les CSM, les cellules endothéliales et les cellules CAR permettent le maintien, la quiescence ou l'auto-renouvellement des CSH dans la moelle osseuse.

CSH : Cellules souches hématopoïétiques, Osteomac : Osteoblast-supportive endosteal macrophage, CAR : CXCL12 abundant reticular, CSM : Cellules souches mésenchymateuses, SNS : Système nerveux sympathique, CXCL12 : C-X-C motif chemokine 12, CXCR4 : C-X-C chemokine receptor 4, TPO : Thrombopoïétine, Ang-1 : Angiopoïétine-1, Mpl : Myeloproliferative leukemia protein, SCF : Stem cell factor, TGFβ : Transforming growth factor β.

prolifèrent (Adams *et al.*, 2006). La niche endostéale, qui est une région hypoxique, va permettre le maintien en quiescence des CSH grâce à un gradient d'oxygène. En effet, dans les régions hypoxiques, le facteur induit par l'hypoxie (HIF-1 $\alpha$ ) est actif et va réguler les voies métaboliques de la cellule conduisant à un état de quiescence (Suda *et al.*, 2011). La quiescence est permise aussi grâce à la sécrétion de cytokines par les ostéoblastes comme la thrombopoïétine (TPO) (Arai *et al.*, 2009) ou l'angiopoïétine-1 (Ang-1) (Gomei *et al.*, 2010) qui, en se fixant sur leur récepteurs respectifs, Myeloproliferative leukemia protein (Mpl) et Tie2, activent notamment des cyclin-dépendant kinase inhibitors (CKI). La seconde niche est la niche péri-vasculaire située à proximité des vaisseaux sanguins et dont les acteurs cellulaires principaux sont les cellules souches mésenchymateuses (CSM), les cellules endothéliales ainsi que les cellules CAR (CXCL12 abondant reticular) qui jouent un rôle central dans le maintien des CSH dans la niche péri-vasculaire en sécrétant le Stem cell factor (SCF), l'Ang-1 et la chimiokine CXCL12 (Mendelson *et al.*, 2014). En contact avec le système nerveux sympathique, les CSH sont maintenues en quiescence grâce à la sécrétion notamment de TGF $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ ) par les cellules de Schwann (Yamazaki *et al.*, 2011).

#### L'auto-renouvellement, la prolifération et la différenciation

Les CSH expriment des récepteurs pour les cytokines permettant la stimulation de voies de signalisation intracellulaires qui conduisent notamment à leur engagement vers une voie de différenciation. Les cytokines appartiennent à une famille de ligands solubles impliqués dans la communication cellule-cellule *via* leur fixation sur des récepteurs spécifiques. Parmi les cytokines impliquées dans l'hématopoïèse, certaines jouent un rôle dans la survie, la prolifération et dans plusieurs voies de différenciation. C'est le cas du SCF, du Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) ou de l'interleukine 3 (IL-3). D'autres cytokines sont plus spécifiques d'une voie comme l'érythropoïétine (Epo), le Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) et le Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) qui sont exclusivement impliqués dans les voies érythroïde, granulocytaire et monocytaire respectivement (Robb, 2007) (Figure 5). Les récepteurs aux cytokines vont être capables d'activer des protéines cytoplasmiques comme les membres de la famille de protéines kinases, Janus Kinase (JAK) (Smithgall, 1998) afin de réguler des voies de signalisation conduisant à la régulation de l'expression de nombreux gènes. Cette régulation intervient à



**Figure 5 : Cytokines, facteurs de transcription et miR qui régulent l'hématopoïèse**

Les CSH s'engagent dans une voie de différenciation sous l'action de différentes combinaisons de cytokines (bleu) afin de générer les différentes cellules présentes dans le sang. L'hématopoïèse est un processus finement régulé par des facteurs de transcription (vert) et des microARN (rouge). Les flèches indiquent une induction et les barres en T une inhibition. CSH : Cellules souches hématopoïétiques, PMP : Progéniteurs multipotents, PMC : Progéniteur myéloïde commun, PME : progéniteur mégacaryocyte/érythrocyte, PGM : progéniteur granulocyte/monocyte, PLC : Progéniteur lymphoïde commun, PE : Progéniteurs érythroïdes, PM : Progéniteurs mégacaryocytaires, Pro-T et Pro-B : pro-lymphocyte B ou T, LT ou LB : Lymphocyte T ou B, SCF : Stem cell factor, TPO : Thrombopoïétine, IL : Interleukine, EPO : Erythropoïétine, GM-CSF : Granulocyte macrophage-colony stimulating factor, G-CSF : Granulocyte-colony stimulating factor, M-CSF : Macrophage-colony stimulating factor, RUNX1 : Runt-related transcription factor 1, Scl/TAL1 : Stem cell leukemia/T-cell acute lymphoblastic leukemia 1, Lmo2 : LIM only protein 2, Gfi-1 : Growth factor independant 1, FOG-1 : Friend of GATA-1, EKLf : Erythroïd Kruppel-like factor, NF-E2 : Nuclear factor-erythroid 2, Fli-1 : Friend leukemia integration, C/EBP : CCAAT-enhancer binding protein 1, EBF : Early B-cell factor 1, TCF-1 : T-cell specific transcription factor 1, XBP1 : X-box binding protein 1. Adapté de (Robb, 2007, Orkin *et al.*, 2008, Bissels *et al.*, 2012).

tous les stades de l'hématopoïèse et elle est permise grâce notamment à des facteurs de transcription (FT) (Figure 5) tels que ceux appartenant à la famille des facteurs GATA ou à la famille des facteurs E26-transformation specific (Ets) qui jouent un rôle primordial dans le développement hématopoïétique (Orkin, 1995). De plus, le réseau de régulation par les FT est interconnecté avec un réseau de microARN (miR) (cf intro page 31) (Figure 5) qui sont transcrits grâce aux FT mais sont également des régulateurs négatifs de ces FT et contribuent ainsi à l'auto-renouvellement, la prolifération et la différenciation des CSH en réponse aux signaux de leur environnement (Lazare *et al.*, 2014).

### **1.2.2 L'érythropoïèse**

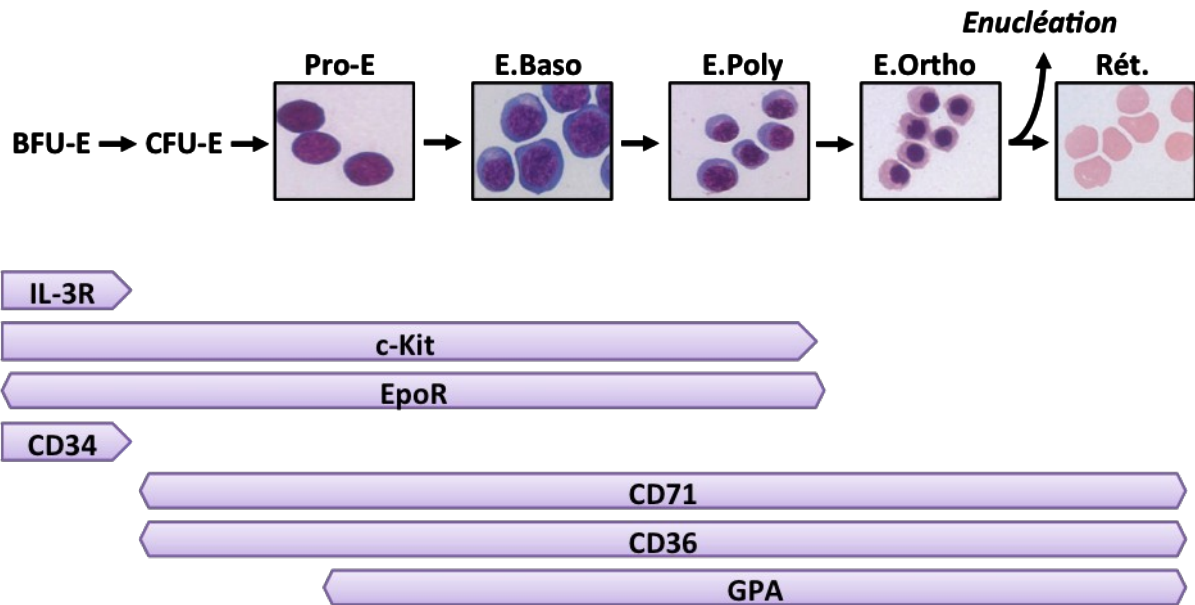
L'érythropoïèse est l'ensemble des processus conduisant à la production des globules rouges (érythrocytes ou hématies) à partir des CSH. Grâce à leur constituant principal, l'Hb, les érythrocytes transportent l'oxygène des poumons vers les tissus et le dioxyde de carbone, des tissus vers les poumons pour l'évacuer. Leur durée de vie est de 120 jours et les CSH vont assurer leur renouvellement afin de répondre aux besoins permanents en oxygène de l'organisme.

#### **1.2.2.1 Modifications cellulaires au cours de l'érythropoïèse**

Au cours du processus d'érythropoïèse, la différenciation des cellules va progresser aux dépens de leur prolifération. Les cellules vont subir différents changements morphologiques jusqu'à atteindre le stade d'érythrocyte. Ainsi, la taille des cellules diminue, la chromatine se condense, les cellules se chargent en Hb puis les organites comme les mitochondries sont éliminés par autophagie pendant la maturation érythroïde terminale. Enfin le noyau est éjecté (énucléation) et est alors appelé pyrénocyte. Les progéniteurs érythroïdes les plus précoces capables d'être identifiés *ex vivo* sont les BFU-E et les CFU-E. Ils ne sont pas reconnaissables morphologiquement mais peuvent être identifiés en culture sur milieux semi-solides (Gregory *et al.*, 1977). Ils peuvent aussi être isolés par cytométrie de flux grâce à leurs marqueurs de surface pour être analysés (Li *et al.*, 2014). Les BFU-E sont les progéniteurs les plus immatures et expriment le marqueur CD34. Ces cellules CD34<sup>+</sup> sont dépendantes du SCF, de l'Epo et d'autres cytokines telles que l'IL-3 pour leur prolifération et leur différenciation en CFU-E. Les CFU-E sont, quant à elles, fortement dépendantes de l'Epo et expriment des marqueurs de différenciation plus tardifs comme le CD36, le récepteur à la transferrine CD71 et le récepteur à l'Epo (EpoR) (Wu *et al.*, 1995, Spivak, 2005, Li *et al.*,

2014). Les différents stades de la différenciation érythroïde terminale peuvent être identifiés grâce à des marqueurs moléculaires spécifiques à chaque stade ou par leur morphologie. La coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG) est souvent utilisée en hématologie pour identifier les différentes cellules du sang. Les éléments acides comme les acides nucléiques fixent les colorants basiques et sont colorés en bleu-violet tandis que les constituants cellulaires basiques comme l'Hb apparaissent rose-orangé.

Le pro-érythroblaste est formé à partir des CFU-E et correspond au premier stade de la maturation érythroïde terminale. C'est une cellule ronde possédant un cytoplasme acide riche en ARN ainsi qu'un rapport nucléocytoplasmique élevé. A ce stade, les cellules commencent à exprimer le marqueur CD235a (glycophorine A) spécifique des cellules érythroblastiques. Le développement du pro-érythroblaste en réticulocyte nécessite 4 à 5 divisions rapides conduisant successivement au stade d'érythroblaste basophile, puis polychromatophile et enfin orthochromatophile. Après énucléation, l'érythroblaste orthochromatophile devient un réticulocyte qui va évoluer en érythrocyte mature possédant un diamètre de 6 à 8  $\mu\text{m}$  (Dzierzak *et al.*, 2013) (Figure 6). L'érythropoïèse est un processus très régulé, notamment par des acteurs cellulaires comme les macrophages médullaires qui composent les îlots érythroblastiques. Ils sont répartis uniformément dans la moelle osseuse (Mohandas *et al.*, 1978) et sont composés d'un macrophage central entouré en général de 5 à 30 érythroblastes à différents stades de différenciation (Lee *et al.*, 1988). Il existe des interactions spécifiques pour la liaison des érythroblastes au macrophage grâce à des molécules d'adhésion telles que l'Erythroblast macrophage protein (Emp), Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) et Intercellular adhesion molecule-4 (ICAM-4) (Manwani *et al.*, 2008). Ces îlots jouent un rôle important dans la maturation, la survie et la prolifération des érythroblastes. En effet, ils sont à l'origine de la sécrétion de certaines cytokines, de l'adhésion à la matrice extracellulaire, de l'élimination des noyaux après énucléation et de la dégradation des érythroblastes abortifs en assurant ainsi le recyclage du fer (Chasis, 2006, Leimberg *et al.*, 2008). Les macrophages médullaires jouent aussi un rôle important dans la modulation de l'érythropoïèse en réponse à une inflammation chronique car ils sécrètent directement des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IFN- $\gamma$  ou le TNF $\alpha$  qui perturbent l'érythropoïèse en inhibant directement la différenciation ou en déstabilisant la liaison des érythroblastes au macrophage (Chasis *et al.*, 2008, Morceau *et al.*, 2009).



**Figure 6 : L'érythropoïèse**

Au cours du développement érythroïde la cellule érythroblastique subit des modifications morphologiques observables après coloration de May-Grünwald Giemsa. Le volume de la cellule diminue, la chromatine se condense, le cytoplasme devient acidophile, correspondant à la formation d'hémoglobine et à la diminution de la quantité d'ARN, puis le noyau est expulsé (énucléation). Les cellules vont exprimer des récepteurs et marqueurs de surface spécifiques du stade de développement : le récepteur à l'interleukine 3 (IL-3R), le récepteur au SCF (c-Kit), le récepteur à l'Epo (EpoR), la glycoprotéine CD34 spécifique des progéniteurs hématopoïétiques, le récepteur à la transferrine (CD71), la protéine membranaire CD36 et la glycophorine A/CD235a (GPA). Adapté de (Spivak, 2005, Hu *et al.*, 2013) BFU-E : Burst forming units-erythroid, CFU-E : Colony forming units-erythroid, Pro-E : Pro-érythroblaste, E.Baso : Erythroblaste basophile, E.Poly : Erythroblaste polychromatophile, E.Orthro : Erythroblaste orthochromatophile, Rét. : Réticulocyte

### 1.2.2.2 L'hémoglobine

#### Généralités

L'Hb est le composant principal des érythrocytes dont la fonction est de transporter le dioxygène (O<sub>2</sub>) vers les tissus et d'évacuer le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), en liant ces molécules grâce à un groupement prosthétique, l'hème. L'Hb est constituée de 4 chaînes protéiques de globine identiques deux à deux. Chaque chaîne de globine est liée à une molécule d'hème. Il existe plusieurs types de globines qui sont exprimées à différents stades du développement et qui sont réparties sur deux locus situés sur les chromosomes 16 et 11. Sur le chromosome 16, le locus  $\alpha$  code les chaînes  $\zeta$ ,  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ . Sur le chromosome 11, le locus  $\beta$  code les chaînes  $\epsilon$ ,  $G\gamma$ ,  $A\gamma$ ,  $\delta$  et  $\beta$  (Stamatoyannopoulos, 2005). Les différentes chaînes de globines vont s'assembler 2 à 2, avec deux chaînes du locus  $\alpha$  et deux chaînes du locus  $\beta$ , pour former l'Hb correspondant au stade de développement. Les Hb embryonnaires appelées Gower 1, Gower 2 et Portland sont respectivement constituées des chaînes  $\zeta_2\epsilon_2$ ,  $\alpha_2\epsilon_2$  et  $\zeta_2\gamma_2$ . Chez le fœtus, c'est le tétramère  $\alpha_2\gamma_2$  qui forme l'Hb fœtale (HbF) qui possède une forte affinité pour l'oxygène (Shiao *et al.*, 2006). Enfin, la forme adulte exprimée dès la naissance possède les tétramères  $\alpha_2\beta_2$  formant l'HbA1 qui est la forme majoritaire et  $\alpha_2\delta_2$  formant l'HbA2 (Manning *et al.*, 2007) (Figure 7). Le SCO contient principalement de l'HbF et de l'HbA (Dupont *et al.*, 2011).

#### Les globines

L'expression des gènes de globines est très finement régulée au niveau spatio-temporel, transcriptionnel et post-transcriptionnel afin de permettre l'expression des globines dans les cellules érythroïdes et pour assurer la formation des différents types d'Hb en fonction du stade de développement. Ce contrôle est assuré localement par des régions promotrices mais aussi à distance par des régions d'ADN régulatrices caractérisées par la présence de sites hypersensibles à la ADNase I (HS : DNase I hypersensitive sites) comme le « locus control region » (LCR) du cluster  $\beta$  ( $\beta$ -LCR) et le MRE (Major regulatory element) du cluster  $\alpha$  ( $\alpha$ -MRE) (Figure 7) (Ribeiro *et al.*, 2008). Le  $\beta$ -LCR est situé entre 4 et 20 kb en amont du cluster  $\beta$  et est constitué de 5 HS. Cet élément permet le passage d'une chromatine « fermée » à une chromatine « ouverte » et interagit avec les promoteurs des gènes du cluster  $\beta$  en formant une boucle (Tolhuis *et al.*, 2002, Patrinos *et al.*, 2004). La sélection du gène de globine correspondant à un stade de développement donné se fait grâce, notamment, au facteur Krüppel like factor (KLF)1, et la chaîne de globine correspondante est transcrite sous

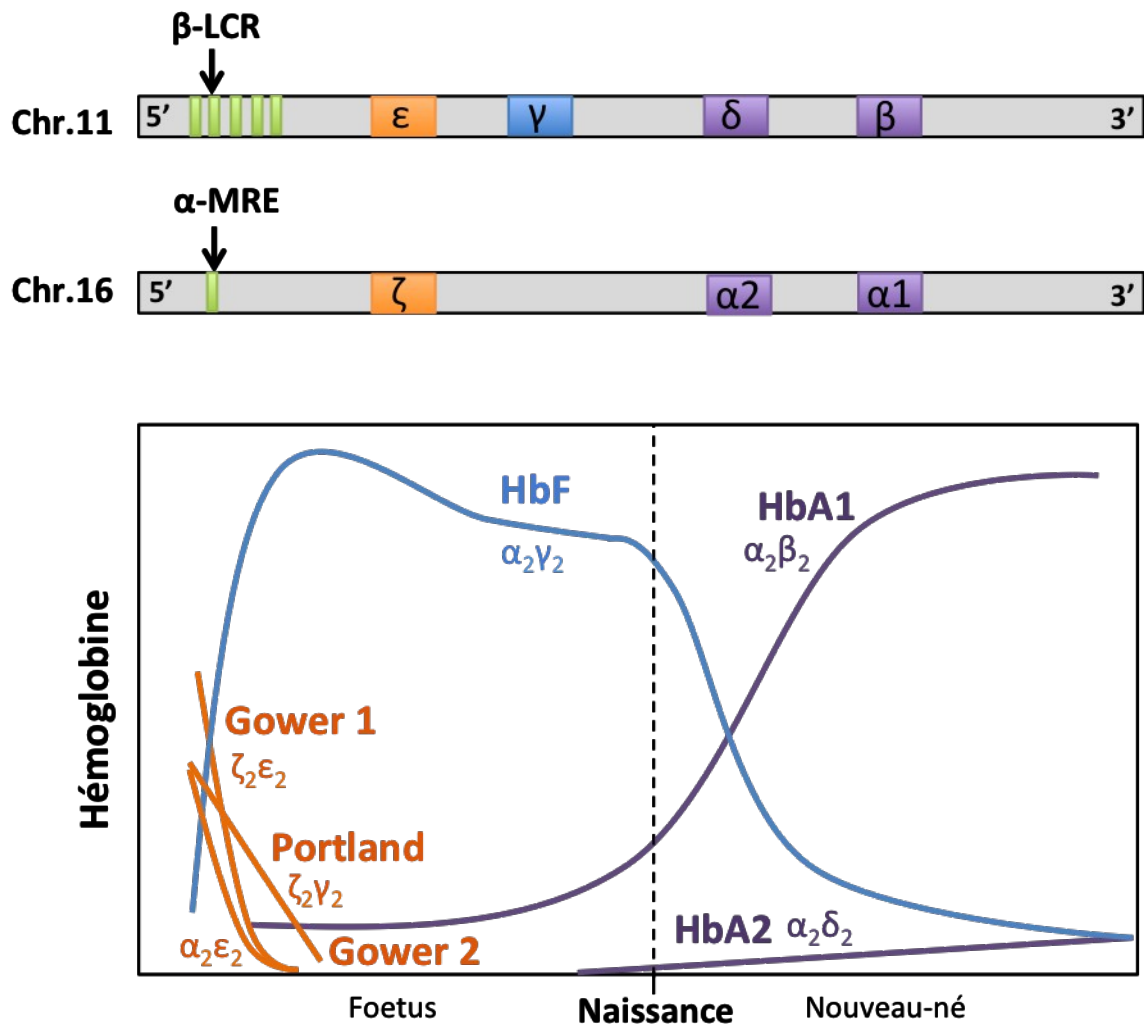


le contrôle de facteurs de transcription tels que GATA-1, TAL1 ou NF-E2 (Lowrey *et al.*, 1992, Cao *et al.*, 2002, Drissen *et al.*, 2004). Le cluster  $\alpha$  possède quant à lui 4 HS dont seulement un, le HS40 a un effet significatif sur l'expression des gènes du cluster  $\alpha$  et est appelé  $\alpha$ -MRE (Jarman *et al.*, 1991). Contrairement au  $\beta$ -LCR, l' $\alpha$ -MRE n'est pas nécessaire pour l'ouverture de la chromatine, le locus  $\alpha$  étant situé dans une zone de chromatine ouverte au niveau de la région télomérique du chromosome 16. Cependant, comme le  $\beta$ -LCR, l' $\alpha$ -MRE contient des sites de fixation pour les FT GATA-1 et NF-E2 et se comporte comme un inducteur de l'activité promotrice de ces gènes (Jarman *et al.*, 1991, Cao *et al.*, 2002).

Afin d'empêcher l'accumulation de chaînes de globine libres dans la cellule, de permettre leur repliement et de faciliter leur incorporation au sein de l'Hb, les chaînes de globines  $\alpha$  sont prises en charge par des protéines chaperonnes telle que l'AHSP ( $\alpha$ -hemoglobin stabilizing protein) appelée également ERAF (Erythroid-associated factor) ou EDRF (Erythroid differentiation-related factor) (Feng *et al.*, 2004). Comme tous les gènes érythroïdes, AHSP est régulé par GATA-1 et empêche la formation de précipité de chaînes de globines  $\alpha$  qui sont toxiques pour la cellule (Gallagher *et al.*, 2005, Yu *et al.*, 2007).

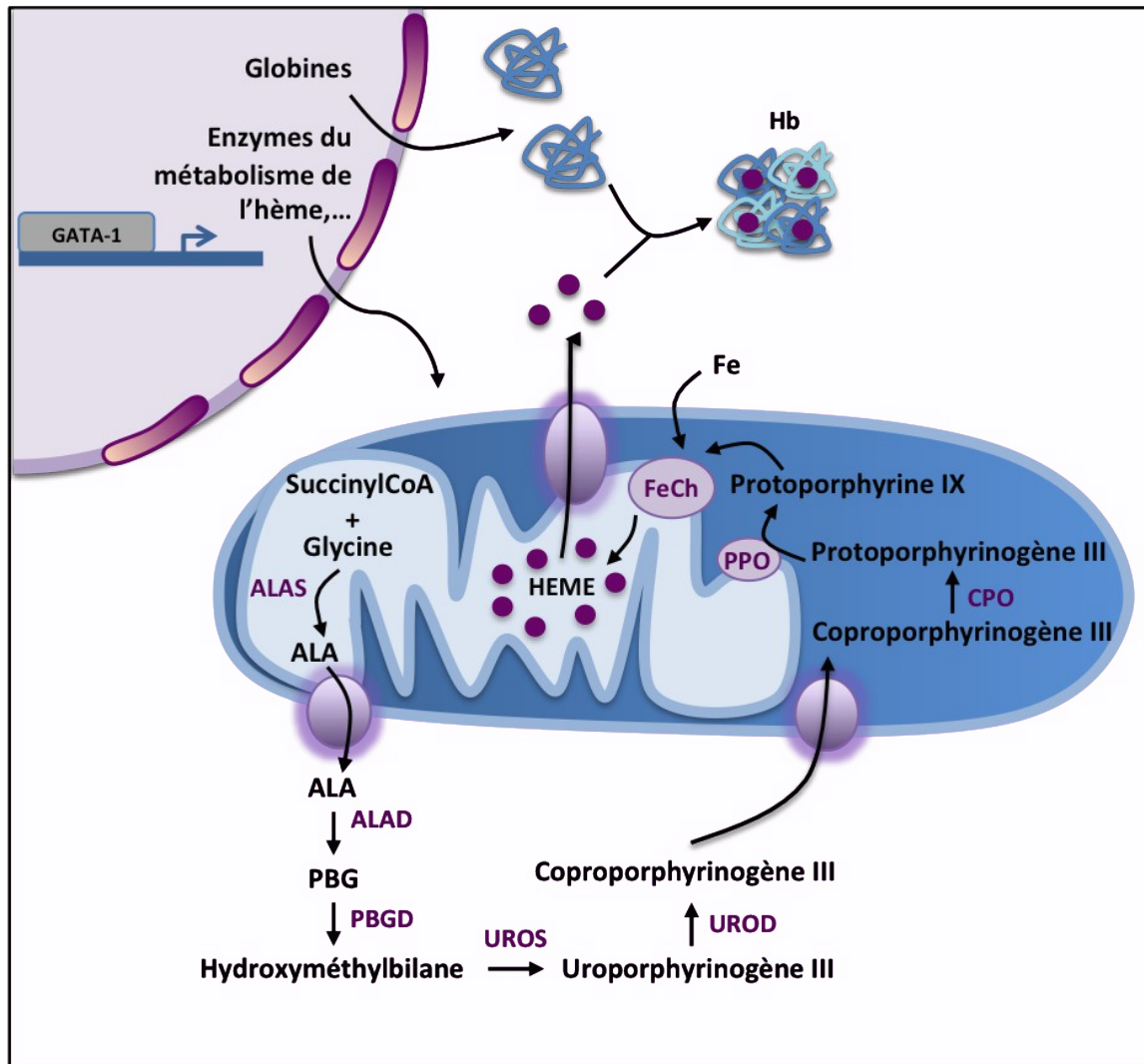
### L'hème

L'hème est synthétisé par 8 enzymes dont 4 sont situées au niveau de la mitochondrie et 4 au niveau du cytoplasme (Figure 8). La condensation du succinyl-coenzyme A et de la glycine au niveau de la mitochondrie donne l'acide 5-aminolévulinique (ALA) grâce à l'acide aminolévulinique synthase (ALAS), qui est transformé au niveau cytoplasmique par la ALA déshydratase (ALAD) en porphobilinogène (PBG). Le PBG est transformé en hydroxyméthylbilane par la PBG désaminase (PBGD) appelée aussi HMBS (hydroxyméthylbilane synthase). L'hydroxyméthylbilane est ensuite transformé en uroporphyrinogène III puis coproporphyrinogène III par l'urogène synthase (UROS) et urogène décarboxylase (UROD) respectivement puis repasse au niveau de la mitochondrie pour être transformé en protoporphyrinogène III puis protoporphyrine IX par la coprogène oxydase (CPO) et la protogène oxydase (PPO). Enfin, la ferrochélatase permet l'incorporation du fer pour constituer l'hème qui va être exporté dans le cytoplasme pour s'associer aux chaînes de globines et former l'Hb (Ponka, 1997, Chiabrando *et al.*, 2014). La transcription de ces enzymes est principalement régulée par les FT GATA-1 et NF-E2 (Mignotte *et al.*, 1989, Cox *et al.*, 1991, Delfau-Larue *et al.*, 1994, Kaya *et al.*, 1994, Tugores *et al.*, 1994, Taketani *et al.*, 1995, Bishop *et al.*, 1996).



**Figure 7 : Les différents types d'hémoglobine au cours du développement**

Les globines composent une famille multigénique située sur les chromosomes 11 (locus  $\beta$ ) et 16 (locus  $\alpha$ ). Ces gènes sont exprimés successivement au cours du développement grâce à des régions régulatrices ( $\alpha$ -MRE et  $\beta$ -LCR). Les chaînes de globines s'associent 2 à 2 pour former une hémoglobine (Hb) adaptée au stade de développement. Chez l'embryon, on retrouve les Hb Gower1, 2 et Portland ( $\zeta_2\epsilon_2$ ,  $\alpha_2\epsilon_2$  et  $\zeta_2\gamma_2$ ), chez le fœtus, l'HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) et chez l'adulte l'HbA1 ( $\alpha_2\beta_2$ ) et l'HbA2 ( $\alpha_2\delta_2$ ). Adapté de (Manning *et al.*, 2007).



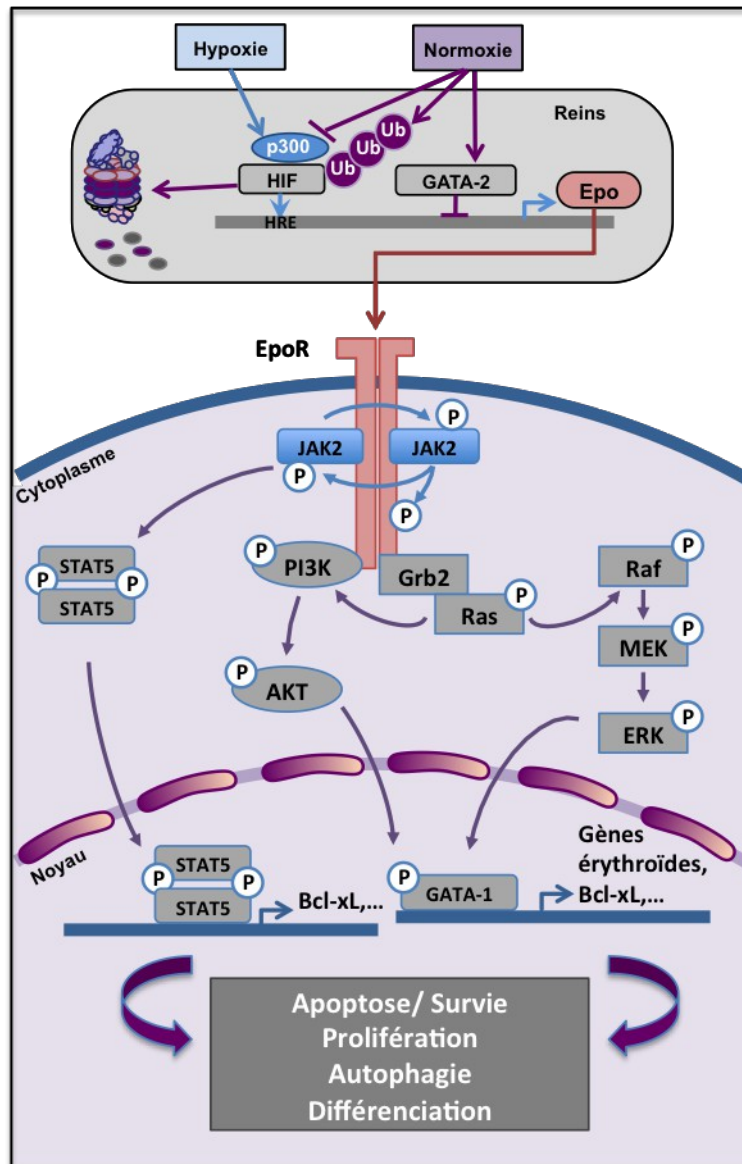
**Figure 8 : Biosynthèse de l'hème**

Le facteur GATA-1 est un des principaux régulateurs de la transcription des gènes codant les enzymes de la biosynthèse de l'hème et des chaînes de globines. L'acide aminolévulinique synthase (ALAS) permet la condensation de succinyl-coenzyme A (succinylCoA) et de la glycine pour former de l'acide 5-aminolévulinique (ALA) au niveau mitochondrial. Les 4 étapes suivantes se déroulent au niveau du cytoplasme. L'ALA y est donc exporté pour être transformé en porphobilinogène (PBG) par l'ALA déshydratase (ALAD) puis le PBG obtenu est pris en charge par la porphobilinogène désaminase (PBGD) pour donner l'hydroxyméthylbilane qui va être converti successivement en uroporphyrinogène III et en coproporphyrinogène III par l'urogène synthase (UROS) et urogène décarboxylase (UROD) respectivement. Le coproporphyrinogène est ré-importé au niveau de la mitochondrie pour former le protoporphyrinogène III puis la protoporphyrine IX grâce à la coprogène oxydase (CPO) et la protogène oxydase (PPO). Le fer est ensuite incorporé par la ferrocélatase (FeCh) pour former l'hème qui va s'associer aux chaînes de globines pour former l'hémoglobine (Hb). Adapté de (Chiabrando *et al.*, 2014).

### 1.2.2.3 L'érythropoïétine

Le développement de l'érythropoïèse est dépendant de cytokines et principalement de l'Epo qui va engager l'action de nombreuses protéines régulatrices en cascade, telles que des kinases et des FT ainsi que des miR. L'Epo est une glycoprotéine produite majoritairement par les reins, capable de contrôler le nombre d'érythrocytes dans la circulation sanguine en régulant l'érythropoïèse. Cependant, il a été démontré que l'Epo peut aussi être synthétisée directement au sein de la niche hématopoïétique par les ostéoblastes (Rankin *et al.*, 2012). Le gène de l'Epo possède un élément de réponse aux conditions d'hypoxie appelé Hypoxia Response Element (HRE) au sein de son promoteur reconnu par le FT hétérodimérique Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1. Dans des conditions de normoxie, sa transcription est réprimée principalement par le facteur de transcription GATA-2 (Tsuchiya *et al.*, 1997). Dans des conditions d'hypoxie, le gène Epo est activé par le facteur HIF-1, composé des sous-unités HIF-1 $\alpha$  dont l'activation est dépendante de la présence d'O<sub>2</sub> et HIF-1 $\beta$  aussi appelé ARNT (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) qui est exprimé de manière constitutive (Warnecke *et al.*, 2004). Le facteur HIF-1 $\alpha$  subit une régulation fine afin de répondre rapidement aux conditions d'hypoxie ou normoxie notamment au niveau post-traductionnel. En effet, HIF-1 possède un domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (DDDO) contenant des résidus proline et lysine qui vont être respectivement hydroxylés et acétylés par des enzymes dépendantes de l'oxygène comme les prolyl-4-hydroxylases (PHD) et Arrest-defective 1 (ARD-1) conduisant au recrutement de la von Hippel Lindau protein (pVHL), une ubiquitinylation de HIF et sa dégradation par le protéasome (Huang *et al.*, 1998). Son interaction avec son co-activateur p300 est aussi modulée en présence d'oxygène. En effet, dans des conditions de normoxie, le facteur inhibiteur de HIF-1 (FIH-1) hydroxyle une asparagine au niveau du domaine d'interaction HIF/p300 empêchant donc la formation du complexe (Lando *et al.*, 2002, Masoud *et al.*, 2015). Une fois produite, l'Epo est libérée dans le flux sanguin pour atteindre les érythroblastes dans la moelle osseuse et interagir avec son récepteur spécifique exprimé à leur surface dès les stades CFU-E et érythroblaste basophile (Spivak, 2005). La dimérisation et le changement de conformation de l'EpoR, provoqués par son interaction avec l'Epo, induit le recrutement et l'autophosphorylation de JAK2 associée à la région cytoplasmique du récepteur. La forme activée de JAK2 va phosphoryler des résidus tyrosines de l'EpoR, ce qui conduit à l'activation de différentes voies de signalisation. Les facteurs de la famille STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) vont être recrutés au niveau des tyrosines

phosphorylées du récepteur et vont être à leur tour phosphorylés par JAK2. Il s'en suit une dimérisation et une activation des facteurs STAT qui vont être transloqués dans le noyau afin d'y réguler la transcription de nombreux gènes-cibles codant des protéines impliquées dans la prolifération et dans la survie cellulaire, comme par exemple la protéine anti-apoptotique Bcl-xL, par STAT5. D'autre part, le récepteur phosphorylé est reconnu par la protéine adaptatrice Grb2 (Growth factor receptor-bound protein-2) qui active la cascade de signalisation Ras-Raf / MAPK (Mitogen-activated protein kinase) / MEK (MAPK ERK kinase) / ERK (Extracellular signal regulated kinase) qui est impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire. De la même manière, la phosphoinositide 3-kinase (PI3K), composée d'une sous-unité régulatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p110, peut être activée indirectement par l'intermédiaire de Ras ou directement par la fixation de la sous-unité p85 au récepteur, favorisant le recrutement de la sous-unité catalytique. L'activation de PI3K conduit à la phosphorylation d'AKT, qui, à son tour régule des protéines ayant un rôle dans la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire comme le facteur de transcription FOXO3A (Forkheadbox O3A). En effet, la phosphorylation de FOXO3A au niveau de la sérine 253 (Kato *et al.*, 2006) conduit à l'inhibition de sa propre activité transcriptionnelle et donc à une inhibition de la transcription de ses cibles comme l'inhibiteur du cycle cellulaire p27, ou des protéines qui ont des rôles antiprolifératifs et pro-apoptotiques comme BTG1 (B cell translocation gene 1), Bim ou TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand). A l'inverse, la phosphorylation de la sérine 7 par la p38MAPK active FOXO3A (Ho *et al.*, 2012). AKT peut aussi phosphoryler et activer le facteur GATA-1 (Zhao *et al.*, 2006) (Figure 9).

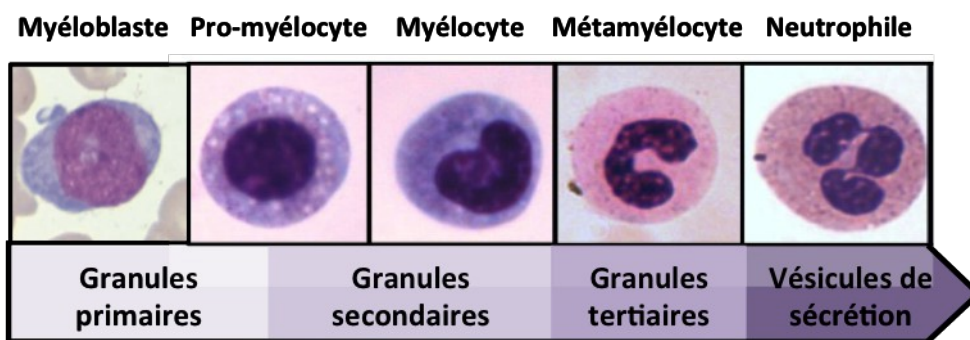


**Figure 9 : Voies de signalisation de l'érythropoïétine**

Dans des conditions de normoxie la liaison HIF/p300 est déstabilisée, le facteur HIF est ubiquitinylé (Ub) puis dégradé par le protéasome et le facteur inhibiteur GATA-2 se fixe au niveau du promoteur du gène de l'érythropoïétine (Epo) pour inhiber sa transcription. Dans des conditions d'hypoxie, le facteur de transcription HIF, grâce à sa liaison avec son co-activateur p300, active la transcription du gène de l'Epo au niveau du rein en se fixant à des séquences HRE (Hypoxia response element). L'Epo produite est libérée dans le flux sanguin jusqu'à atteindre des cellules qui présentent le récepteur à l'Epo (EpoR) à leur surface. L'interaction Epo/EpoR active différentes voies de signalisation telles que les voies JAK2/STAT5, PI3K/AKT et la voie des MAPK qui régulent l'expression de gènes impliqués dans la différenciation, la prolifération ou dans la survie cellulaire comme Bcl-xL par l'intermédiaire de facteurs de transcription tels que GATA-1 ou STAT5. Adapté de (Chateauvieux *et al.*, 2011).

### 1.2.3 La granulopoïèse neutrophile

La granulopoïèse neutrophile est l'ensemble des processus conduisant à la production, à partir des CSH, d'un certain type de granulocytes appelés polynucléaires neutrophiles (PNN) ou plus simplement neutrophiles. Ce sont des cellules de l'immunité innée rapidement mobilisables en cas d'infection et d'inflammation qui participent notamment à l'élimination des pathogènes par phagocytose. Le nom « granulocyte » est dû à l'acquisition au cours de la différenciation, de différents types de granules contenant des facteurs de défense et des enzymes comme les défensines, la myéloperoxydase, l'élastase et des métalloprotéases matricielles (Borregaard *et al.*, 2007). La différenciation granulocytaire comprend 5 étapes identifiables morphologiquement (Figure 10) (Ward *et al.*, 2000, Pillay *et al.*, 2013). Les progéniteurs granulocyte/monocyte vont donner des myéloblastes puis les pro-myélocytes qui sont des cellules de grande taille avec un noyau rond et volumineux, un cytoplasme basophile et l'apparition de granules primaires azurophiles. Les pro-myélocytes donnent naissance aux myélocytes qui sont également des cellules volumineuses avec un cytoplasme basophile, l'apparition de granules secondaires colorés en brun par MGG et un noyau ovale excentré. Les myélocytes donnent les métamyélocytes caractérisés par un cytoplasme qui devient acidophile et un noyau qui commence à s'incurver. Ces cellules présentent également des granules tertiaires identifiables par MET. Enfin, le noyau du métamyélocyte est segmenté pour former un noyau polylobé et il y a formation de vésicules de sécrétion pour former un PNN (Pillay *et al.*, 2013). La granulopoïèse est induite par l'action de plusieurs cytokines comme le GM-CSF, l'IL-3 et le G-CSF. En se fixant à leurs récepteurs respectifs, ces cytokines activent différentes voies de signalisation comme JAK/STAT, Ras/MEK/ERK et PI3K/AKT ainsi que p38 et NF- $\kappa$ B, impliquées dans la différenciation, la survie et la prolifération (Sato *et al.*, 1993, Wang *et al.*, 2003, Steelman *et al.*, 2004, Marino *et al.*, 2008, van de Laar *et al.*, 2012). De nombreux groupes ont montré l'implication de ces voies dans la différenciation granulo-monocytaire (Miranda *et al.*, 2002, Buitenhuis *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2009, Martelli *et al.*, 2010, Souza *et al.*, 2013, Rozman *et al.*, 2015).



**Figure 10: La granulopoïèse neutrophile**

Au cours du développement granulocytaire, le myéloblaste subit des modifications morphologiques observables après coloration de May-Grünwald Giemsa. Le noyau s'incurve puis est segmenté, le cytoplasme devient acidophile et il y a apparition de différents types de granules. Adapté de (Vido *et al.*, 2011, Pillay *et al.*, 2013).



#### **1.2.4 La monocytopoïèse**

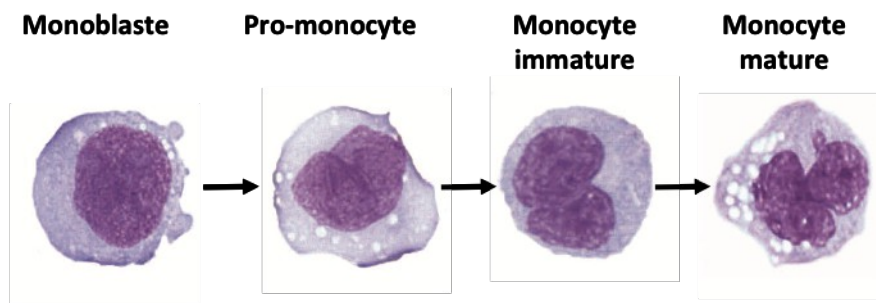
La monocytopoïèse correspond au processus de production des monocytes à partir des CSH au sein de la moelle osseuse. Les monocytes sont des cellules retrouvées dans la circulation sanguine qui donnent naissance aux macrophages tissulaires et aux cellules dendritiques. Ces cellules phagocytaires participent notamment à l'élimination des cellules mortes, des débris cellulaires, des substances étrangères et organisent le processus d'inflammation (Varol *et al.*, 2015). La différenciation terminale en monocyte comprend 4 étapes identifiables morphologiquement après coloration MGG. Les monoblastes sont des cellules de grande taille (20-30  $\mu\text{m}$ ), ils ont un noyau rond/ovale, possèdent un nucléole, un cytoplasme basophile et présentent quelques granules azurophiles. Le noyau des monoblastes s'allonge et se replie pour former des pro-monocytes. Puis, les pro-monocytes donnent des monocytes immatures avec un cytoplasme moins basophile et un noyau condensé. Enfin, les monocytes matures présentent un noyau lobulé (Goasguen *et al.*, 2009) (Figure 11). Ces cellules expriment le marqueur CD11b mais également le CD14 qui leur est plus spécifique (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010). Le développement monocyttaire est induit par différents stimuli tels que l'IL-3, le GM-CSF, Flt3L (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) et le M-CSF (Stirewalt *et al.*, 2003, Barreda *et al.*, 2004). Ainsi, ces différentes cytokines activent des voies de signalisation qui vont permettre la différenciation monocyttaire telles que PI3K/AKT, la voie MAPK, JAK/STAT ainsi que les PKC $\alpha$  et  $\beta$  (Stirewalt *et al.*, 2003, Zhang *et al.*, 2006, Miranda *et al.*, 2007).

#### **1.2.5 Réseau de régulation « facteurs de transcription/microARN »**

##### **1.2.5.1 Les facteurs de transcription**

###### Les facteurs GATA-1 et GATA-2

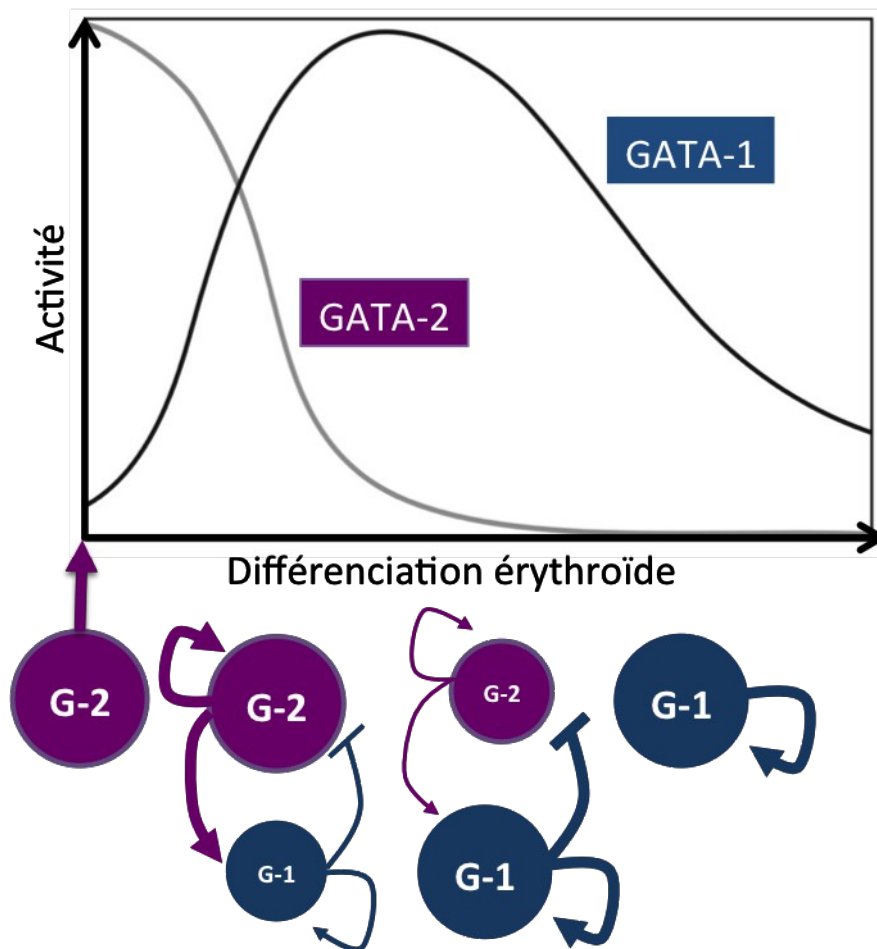
Les FT de la famille GATA jouent un rôle important dans la différenciation des cellules hématopoïétiques et compte six membres divisés en deux sous-groupes : les facteurs GATA-1, -2, -3 sont exprimés principalement dans la lignée hématopoïétique tandis que les facteurs GATA-4, -5 et -6 sont exprimés dans les tissus issus de l'endoderme et du mésoderme comme le cœur, les poumons, l'intestin, l'estomac et les vaisseaux sanguins. Cependant, le facteur GATA-1 a été identifié dans les cellules de Sertoli chez la souris et participe à la régulation par les œstrogènes du développement testiculaire normal (Yomogida *et al.*, 1994, Lucas *et al.*, 2014).



**Figure 11 : Etapes de la monocytopoïèse**

Au cours de la différenciation, le monoblaste subit des modifications morphologiques observables après coloration de May-Grünwald Giemsa. Le noyau s’allonge et se replie, se condense puis devient lobulé et le cytoplasme basophile présente quelques granules azurophiles. Adapté de (Goasguen *et al.*, 2009).

Les facteurs GATA-1 et GATA-2 collaborent étroitement tout au long de l'érythropoïèse pour réguler la transcription des gènes érythroïdes. Ces facteurs ont une structure contenant un domaine de trans-activation ainsi que deux motifs à doigt de zinc reconnaissant la séquence (A/T)GATA(A/G) (Merika *et al.*, 1993). Le domaine C-terminal assure la liaison à l'ADN et le domaine N-terminal module cette interaction en liant différentes protéines co-régulatrices comme FOG-1 (Friend of GATA)-1 (Trainor *et al.*, 1996). GATA-1 est requis pour la maturation terminale des érythrocytes et son expression est induite au cours du développement érythroïde. Le facteur de transcription GATA-1 joue un rôle essentiel dans l'érythropoïèse en activant la transcription des gènes érythro-spécifiques tels que les gènes de globines, d'EpoR, de la GPA ou des enzymes du métabolisme de l'hème comme la porphobilinogène désaminase (PBGD) (Frampton *et al.*, 1990, Zon *et al.*, 1991). La transcription du gène de GATA-1 est régulée par le facteur GATA-1 lui-même mais aussi par d'autres FT comme GATA-2 (Tsai *et al.*, 1991, Ohneda *et al.*, 2002). Le facteur GATA-2 est impliqué dans l'auto-renouvellement et la prolifération des CSH et des précurseurs hématopoïétiques où il est fortement exprimé (Ling *et al.*, 2004). De manière intéressante, GATA-1 inhibe l'expression de GATA-2 qui lui-même joue un rôle inhibiteur de l'érythropoïèse (Ikonomi *et al.*, 2000a, Ikonomi *et al.*, 2000b, Grass *et al.*, 2003). Ainsi, le processus de différenciation érythroïde est régulé au cours du temps grâce à un changement d'équilibre entre les facteurs GATA-1 et GATA-2 qui sont en compétition pour les mêmes sites de fixation au niveau des promoteurs des gènes spécifiques de la voie érythroïde (Figure 12). Le facteur GATA-2 est capable de réguler sa propre transcription mais aussi de réguler positivement celle du gène GATA-1 au début de l'érythropoïèse. Il s'en suit une augmentation de l'expression de GATA-1 qui conduit à l'inhibition de la transcription de GATA-2 puis à un arrêt de l'auto-renouvellement et de la prolifération des progéniteurs afin de permettre leur différenciation (Bresnick *et al.*, 2010). Un déséquilibre de cette balance GATA-1/GATA-2 conduit à des désordres hématologiques notamment de l'érythropoïèse. GATA-1 intervient également dans le contrôle de la survie des érythroblastes en régulant l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-xL (Gregory *et al.*, 1999). GATA-1 peut aussi être clivé par la caspase 3, ce qui conduit à l'apoptose. Cependant, ce FT est protégé du clivage par la protéine chaperonne Hsp (Heat shock protein) 70 (Ribeil *et al.*, 2007). Les facteurs GATA-1 et GATA-2 peuvent subir des modifications post-traductionnelles (acétylation, phosphorylation, ubiquitination et sumoylation). L'acétylation des deux facteurs est catalysée par l'acétyltransférase p300 afin de favoriser leur liaison à l'ADN et d'augmenter leur



**Figure 12 : La balance GATA-1/GATA-2**

Le facteur de transcription GATA-2 (G-2) est impliqué dans l'auto-renouvellement et la prolifération des cellules souches et des précurseurs hématopoïétiques où il est fortement exprimé. Le facteur GATA-2 régule sa propre transcription mais aussi la transcription du facteur GATA-1 (G-1). L'augmentation de GATA-1 conduit à une inhibition de l'expression de GATA-2 au cours de l'érythropoïèse. Le facteur GATA-1 va induire sa propre transcription ainsi que celle des gènes érythro-spécifiques. Adapté de (Ferreira *et al.*, 2005, Shimizu *et al.*, 2008).

activité transcriptionnelle ou au contraire favoriser leur ubiquitination. L'ubiquitination des facteurs GATA entraîne leur dégradation par le protéasome alors que le rôle exact de la sumoylation reste incertain (Hernandez-Hernandez *et al.*, 2006, Lurie *et al.*, 2008). Ces différentes modifications peuvent également moduler l'interaction de GATA-1 avec d'autres cofacteurs ou d'autres facteurs de transcription.

### FOG-1 (Friend of GATA)-1

FOG-1 est une protéine à 9 doigts de zinc exprimée dans les cellules érythroïdes et mégacaryocytaires (Tsang *et al.*, 1997). Son interaction avec GATA-1 au niveau de la région N-terminale est essentielle pour le déroulement normal de l'érythropoïèse et nécessite 4 des 9 doigts de zinc (Tsang *et al.*, 1997, Fox *et al.*, 1999). En effet, une mutation de GATA-1 (V205M) au niveau du doigt de zinc situé en N-terminal empêche le recrutement de FOG-1 et conduit à l'anémie chez l'Homme (Nichols *et al.*, 2000). Une délétion de FOG-1 entraîne un blocage de l'érythropoïèse et l'absence de développement mégacaryocytaire (Tsang *et al.*, 1998). Par exemple, le TNF $\alpha$  entraîne une inhibition du développement érythroïde en accord avec une diminution de l'expression de FOG-1 et de son interaction avec GATA-1 dans les lignées érythroleucémiques (Buck *et al.*, 2009). FOG-1 permet la liaison de GATA-1 au niveau de certains sites comme le promoteur de la globine  $\beta$  (Letting *et al.*, 2004, Vakoc *et al.*, 2005). FOG-1 va également contribuer à la substitution de GATA-2 par GATA-1 en facilitant la liaison de GATA-1 au niveau des sites occupés par GATA-2 (Pal *et al.*, 2004). FOG-1 est aussi nécessaire à la répression de l'expression des gènes par GATA-1. L'inhibition de la transcription implique une diminution de l'acétylation des histones et FOG-1 peut interagir avec le complexe NuRD (Nucleosome Remodeling and deacetylase) comprenant des ATPases et des sous-unités HDAC1 et 2 (Hong *et al.*, 2005, Miccio *et al.*, 2010, DeVilbiss *et al.*, 2016).

### EKLF/Klf1

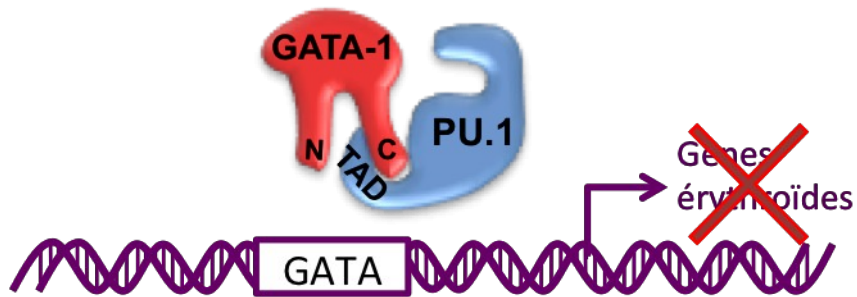
Le FT EKLF/Klf1 (Erythroid Krüppel-like factor/Krüppel-like factor 1) interagit également avec GATA-1. L'interaction Klf1/GATA-1 augmente l'activité transcriptionnelle de GATA-1 (Merika *et al.*, 1995, Gregory *et al.*, 1996). Ce facteur est nécessaire à l'érythropoïèse et l'absence de Klf1 conduit à l'anémie chez la souris (Nuez *et al.*, 1995). Klf1 intervient également dans le « switch » des globines au cours du développement (Siatecka *et al.*, 2011). La transcription de ce facteur est permise grâce au complexe GATA-1/TAL1/Ldb1/Lmo2/E2a

(Wadman *et al.*, 1997).

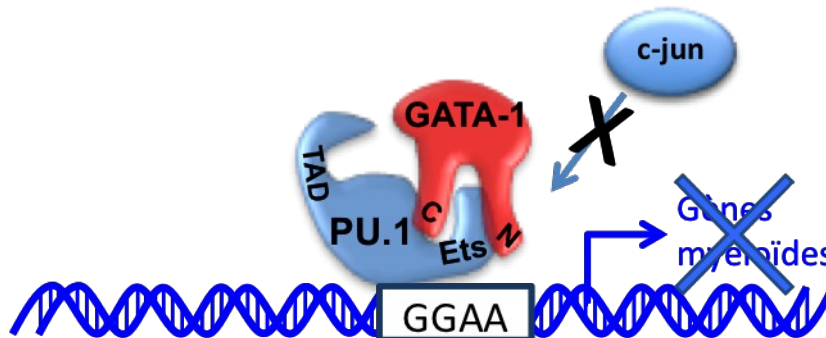
TAL1/Ldb1/Lmo2/E2A: GATA-1 appartient à un complexe formé de Ldb1 (LIM domain binding protein 1), Lmo2 (LIM domain only 2), TAL1 (T-cell acute lymphoblastic leukemia 1) et E2A qui active la transcription des promoteurs contenant une boîte E de séquence consensus CANNTG séparée de 9 nucléotides d'un site de liaison GATA (Wadman *et al.*, 1997). Ce complexe coopère avec Klf1 pour induire la transcription des gènes érythroïdes (Love *et al.*, 2014). En effet, une étude d'immunoprécipitation de la chromatine suivi d'un séquençage haut débit (ChIP-Seq) a montré la co-occupation par GATA-1, TAL1 et Klf1 sur des éléments régulateurs de plus de 300 gènes impliqués dans le développement érythroïde (Wontakal *et al.*, 2012).

Le facteur PU.1 (Spi1): Le facteur PU.1 (Spi1) appartient à la famille de facteurs de transcription Ets et est essentiel pour l'hématopoïèse et la détermination du destin cellulaire. Cette protéine possède un domaine de transactivation nécessaire à l'activation transcriptionnelle, un domaine PEST et un domaine Ets de liaison à l'ADN qui reconnaît la séquence GGAA (Kodandapani *et al.*, 1996). PU.1 peut interagir ou coopérer avec de nombreux partenaires comme les facteurs myéloïdes C/EBP, c-Jun et c-Myb ou érythro/mégacaryocytaires comme GATA-1 et GATA-2 (Bjerregaard *et al.*, 2003, Burda *et al.*, 2010, Friedman, 2015). C'est un facteur essentiel de la différenciation des monocytes/macrophages, granulocytes ainsi que des lymphocytes mais son expression est inhibée dans les lignées érythroïdes et mégacaryocytaires. En effet, une délétion de PU.1 chez la souris conduit à une absence de lymphocytes B, monocytes et granulocytes (Scott *et al.*, 1994). De plus, Dahl R. *et al.*, ont montré que des niveaux bas de PU.1 induisaient préférentiellement la granulopoïèse alors que des niveaux plus élevés favorisaient la monocytopoïèse (Dahl *et al.*, 2003). C-jun joue un rôle de co-activateur de PU.1 au niveau de nombreux promoteurs de gènes myéloïdes comme le récepteur du M-CSF et le marqueur CD11b (Pahl *et al.*, 1993, Ross *et al.*, 1998, Behre *et al.*, 1999). D'autre part, GATA-1 et PU.1 interagissent et s'inhibent mutuellement (Figure 13) (Rekhtman *et al.*, 1999). PU.1 inhibe l'expression des gènes érythroïdes *via* sa liaison au doigt de zinc en C-terminal de GATA-1 empêchant ainsi sa liaison à l'ADN (Chen *et al.*, 1995, Zhang *et al.*, 2000). Réciproquement, GATA-1 se lie au niveau du domaine Ets de PU.1 empêchant ainsi le recrutement de c-jun nécessaire à l'interaction de PU.1 avec le promoteur de ses gènes cibles (Nerlov *et al.*, 2000). Ainsi, GATA-1 et PU.1 apparaissent comme des déterminants essentiels du destin cellulaire (Iwasaki *et al.*, 2007, Graf *et al.*, 2009, Burda *et al.*, 2010).

A



B



**Figure 13 : L'antagonisme GATA-1/PU.1**

Les facteurs de transcription GATA-1 et PU.1 interagissent l'un avec l'autre et s'inhibent mutuellement pour déterminer le destin cellulaire. **A.** PU.1 inhibe l'expression des gènes érythroïdes en interagissant avec le domaine C-terminal de GATA-1 (C) *via* son domaine de transactivation (TAD). **B.** GATA-1 inhibe l'activité de PU.1 en se liant *via* le C-terminal au domaine Ets de PU.1 empêchant ainsi le recrutement de son co-activateur c-jun et son interaction avec l'ADN. Adapté de (Morceau *et al.*, 2004).

L'utilisation d'un siARN (small interfering) contre PU.1 conduit à un déséquilibre de cette balance et à une reprogrammation des monocytes humains isolés à partir de sang périphérique vers la lignée érythroïde avec une diminution de l'expression du marqueur CD14 et l'induction de l'expression des globines (Nouri *et al.*, 2016). De la même manière, une expression ectopique de GATA-1 dans les monocytes inhibe l'expression des marqueurs monocytaires et induit l'expression de marqueurs érythrocytaires et mégacaryocytaires (Visvader *et al.*, 1992, Kulesa *et al.*, 1995).

### 1.2.5.2 Les microARN

Outre les FT, les miR sont également impliqués dans le réseau complexe de régulation des différentes voies de l'hématopoïèse. De plus, la transcription des gènes codant pour ces miR spécifiques est régulée par certains FT hématopoïétiques comme GATA-1 et PU.1.

#### Généralités

Les miR sont des régulateurs essentiels de l'hématopoïèse. Ce sont de petits ARN non codant de 20 à 22 nucléotides, transcrits par l'ARN polymérase II (Lee *et al.*, 2004) et très conservés dans l'évolution (Grimson *et al.*, 2008). Ils s'apparient avec la région 3'-non traduite (3'-NT) des ARNm afin de bloquer la traduction ou d'induire leur dégradation (Fabian *et al.*, 2010). Les gènes codant les miR peuvent être organisés en groupes ou « clusters » sous le contrôle d'un même promoteur, comme le cluster de miR-144/451 (Cheloufi *et al.*, 2010) ou 23a/27a/24 (Chhabra *et al.*, 2010).

#### Biogénèse des microARN

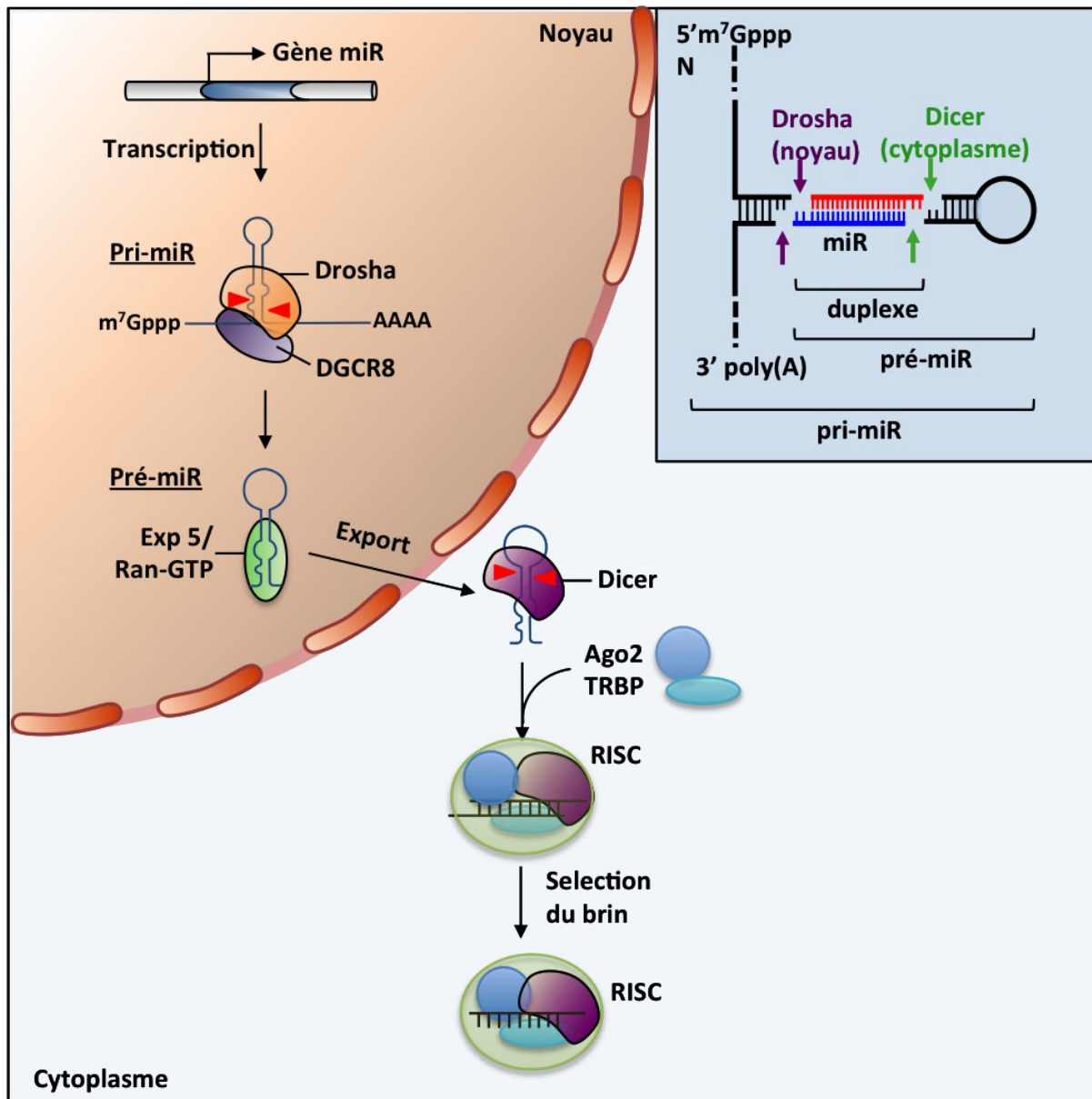
Les miR sont d'abord synthétisés sous forme de miR primaire (pri-miR). Ils peuvent être codés dans des unités géniques indépendantes ou être inclus dans une unité génique codant pour des pré-ARNm, et se présenter soit sous forme polycistronique formée d'un groupe de plusieurs tige-boucles d'ARN double brin, soit sous forme monocistronique (Kim *et al.*, 2009). Chacune des tige-boucles donne à terme un miR spécifique. Les pri-miR sont pris en charge dans le noyau par un complexe appelé microprocesseur composé des protéines Drosha et de DGCR8 (DiGeorge syndrome chromosomal region 8). DGCR8 est une protéine de liaison à l'ARN double brin et servirait de guide pour Drosha, une ribonucléase (RNase) de type III, qui clive le pri-miR au niveau du double brin pour former le miR précurseur (pré-miR). Le pré-miR est ensuite exporté du noyau vers le cytoplasme grâce au système Exportine 5/ Ran-GTP (Zeng *et al.*, 2004) où l'enzyme Dicer, qui est aussi une RNase de type



III, va permettre le clivage de la boucle pour donner un duplexe d'ARN. L'ARN double brin va alors être incorporé au niveau du complexe RISC (RNA-induced silencing complex) composé de Dicer, Ago2, TRBP (TAR RNA binding protein) et former le miR mature simple brin (Figure 14). Si l'appariement du miR à la région 3'-NT d'un ARNm cible est partiel, il y aura une répression de la traduction de ce miR, si l'appariement est total, l'ARNm sera dégradé.

### Les miR inducteurs de l'érythropoïèse

Les miR-144 et 451 appartiennent à un même cluster et sont portés par un même pri-miR dont la transcription est régulée par le facteur GATA-1 (Dore *et al.*, 2008). Ces deux miR jouent un rôle important dans le développement érythroïde. En effet, une extinction du miR-451 chez le poisson zèbre inhibe l'érythropoïèse (Pase *et al.*, 2009). De plus, les souris déficientes pour le cluster 144/451 présentent un blocage de la maturation érythroïde terminale conduisant à une anémie (Rasmussen *et al.*, 2010). A l'inverse, la transfection d'un analogue du miR-451 dans les cellules érythroleucémiques K562 ou dans des CSH de SCO induit l'érythropoïèse indépendamment des cytokines ou de l'ajout de substances différenciantes (Bruchova-Votavova *et al.*, 2010, Kouhkan *et al.*, 2013). Les résultats précédemment obtenus au laboratoire montrent également une diminution de l'expression des miR-144 et 451 en réponse à l'acide valproïque en accord avec une inhibition de l'érythropoïèse (Trecul *et al.*, 2014). Le miR-451 joue également un rôle anti-inflammatoire en empêchant l'activation de NF- $\kappa$ B (Sun *et al.*, 2016). Le miR-451 a pour cible GATA-2 chez le poisson zèbre en accord avec l'induction de l'érythropoïèse (Pase *et al.*, 2009). Il cible également l'ARNm de la protéine 14-3-3 $\zeta$  dans la réponse des cellules érythroïdes de poisson zèbre au stress oxydant (Yu *et al.*, 2010) et de c-myc dans des cellules de cancer du poumon (Chen *et al.*, 2014). De plus, l'inhibiteur de l'érythropoïèse RAB14 est ciblé par les deux miR au cours de l'érythropoïèse chez l'Homme (Kim *et al.*, 2015). Le miR-486 est également un miR dont la transcription est régulée par GATA-1 (Shaham *et al.*, 2015). Son expression est augmentée au cours de l'érythropoïèse en corrélation avec une augmentation de la globine  $\gamma$  et une expression ectopique du miR induit la différenciation érythroïde dans les cellules CD34<sup>+</sup> ou TF-1 (Lulli *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2015a, Shi *et al.*, 2017).



**Figure 14 : Biogénèse des miR**

Après leur transcription, les pri-miR sont clivés par Drosha pour former une tige-boucle appelée pré-miR. Celui-ci est transporté dans le cytoplasme grâce au système exportine 5/Ran-GTP où il est clivé par Dicer pour former un duplexe d'ARN. Le duplexe est ensuite intégré dans le complexe RISC pour former le miR mature.

miR : microARN, DGCR8 : DiGeorge syndrome chromosomal region 8, Exp5 : Exportine 5, GTP : Guanosine tri-phosphate, TRBP : TAR RNA binding protein, RISC : RNA-induced silencing complex. Adapté de (Kim *et al.*, 2009).

Le miR-16 est décrit comme un inducteur de l'érythropoïèse, cependant son expression est augmentée lors de la différenciation neutrophile de cellules de leucémie myéloïde aiguë (LMA) par l'ATRA (Bissels *et al.*, 2012, Palma *et al.*, 2012).

### Les miR inhibiteurs de l'érythropoïèse

Les miR-146a et 155 sont des miR impliqués dans la régulation de la réponse inflammatoire. En effet, leur expression est augmentée en réponse aux stimuli pro-inflammatoires comme le LPS, l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  (Sheedy *et al.*, 2008, Starczynowski *et al.*, 2011). La transcription de ces deux miR est induite par NF- $\kappa$ B (Taganov *et al.*, 2006, O'Connell *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2017). Ils peuvent également être induit par PU.1 (Ghani *et al.*, 2011). L'expression du miR-155 diminue au cours de l'érythropoïèse (Masaki *et al.*, 2007). De plus, Starczynowski DT *et al.*, ont montré que le miR-146a est un miR inhibiteur de l'érythropoïèse et que sa surexpression inhibe également la lymphopoïèse alors qu'il induit une expansion des cellules myéloïdes (Starczynowski *et al.*, 2011). Une expression ectopique du miR-146a est suffisante pour différencier les CSH de souris en cellules myéloïdes (Ghani *et al.*, 2011). En revanche, une surexpression du miR-146a diminue la mégacaryopoïèse (Labbaye *et al.*, 2008). Ces deux miR exercent un rétrocontrôle sur les voies qui permettent leur activation. En effet, le miR-146a cible les protéines impliquées dans la signalisation des TLR (Toll-like receptor) comme TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6), IRAK1 (interleukine 1 receptor-associated kinase), FADD (Fas-associated death domain) et cible également le récepteur de SDF-1 : CXCR4 (Taganov *et al.*, 2006, Labbaye *et al.*, 2008, Curtale *et al.*, 2010, Sheng *et al.*, 2016). De la même manière, le miR-155 cible FADD, IKK $\epsilon$ , RIPK (Receptor interacting protein kinase) ainsi que PU.1 (Tili *et al.*, 2007, Vigorito *et al.*, 2007, Thompson *et al.*, 2011). Comme les miR-155 et 146a, le miR-23a est également induit par NF- $\kappa$ B ou PU.1 et cible différents éléments du protéome érythroïde comme par exemple l'ARNm de la GPA (Kong *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2015b). Le miR-223 est un miR inhibiteur de l'érythropoïèse et inducteur de la granulopoïèse. Son expression est induite par des facteurs de transcription tels que PU.1 ou CEBP $\alpha$  (Fazi *et al.*, 2005, Sugatani *et al.*, 2009). Une surexpression du miR-223 induit la granulopoïèse et bloque la différenciation érythroïde et monocyttaire de CSH CD34<sup>+</sup> (Vian *et al.*, 2014). Le miR-223 inhibe l'érythropoïèse en ciblant Lmo2, le composant du complexe GATA-1/TAL1/Ldb1/Lmo2/E2A (Felli *et al.*, 2009). De plus, le miR-223 cible le FT NFI-A inhibiteur de la granulopoïèse (Fazi *et al.*, 2005). L'expression d'autres miR comme les miR-221, 126 et -15a est diminuée au cours de l'érythropoïèse, ce qui suggère un

rôle potentiellement négatif pour ces miR (Felli *et al.*, 2005, Zhao *et al.*, 2009, Huang *et al.*, 2011). De plus, l'expression du miR-221 conduit à l'activation de NF- $\kappa$ B (Zhao *et al.*, 2016).

## **1.2.6 Rôle de l'autophagie**

### **1.2.6.1 Les différents types d'autophagie**

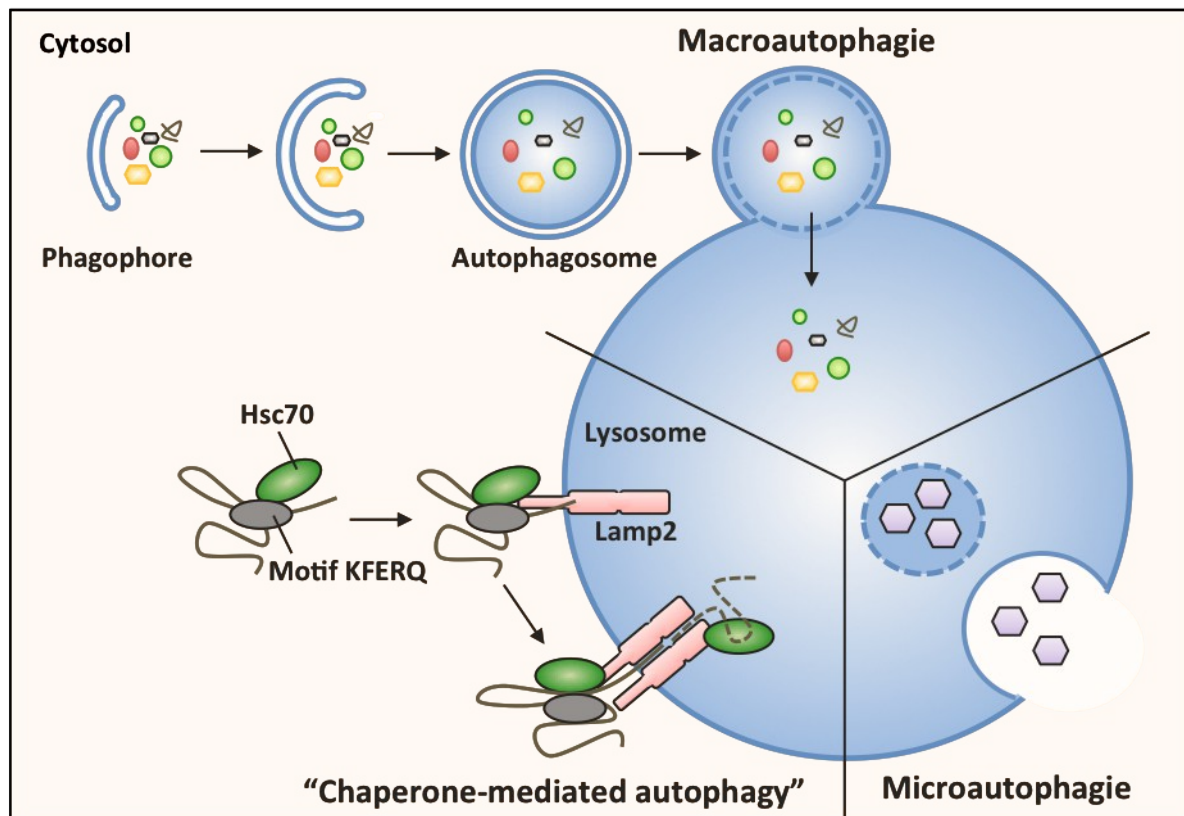
L'autophagie est un processus de dégradation intracellulaire hautement conservé chez les eucaryotes. Le terme « autophagie » provient du grec « auto », « soi-même » et « phagein », « manger ». La cellule assure ainsi le maintien de l'homéostasie cellulaire en dégradant ses composants pour satisfaire ses besoins en énergie. Ainsi l'autophagie est un processus nécessaire à la survie cellulaire mais peut aussi, dans des conditions défavorables, contribuer à la mort cellulaire. Il existe différents types d'autophagie, dont les principaux sont l'autophagie impliquant des protéines chaperonnes (CMA pour Chaperone-mediated autophagy), la microautophagie et la macroautophagie appelée couramment autophagie (Boya *et al.*, 2013) (Figure 15).

#### « Chaperone-mediated autophagy »

La CMA est une forme d'autophagie dans laquelle les protéines cytosoliques contenant un motif spécifique KFERQ dans leur séquence d'acides aminés sont adressées aux lysosomes pour y être dégradées (Dice *et al.*, 1986). La protéine chaperonne hsc70 (heat shock cognate protein) se lie au motif KFERQ formant un complexe reconnu par la protéine Lamp2A (Lysosome-associated membrane protein 2A). La fixation de la protéine va alors engendrer une multimérisation de Lamp2A qui permet la translocation de la protéine d'intérêt dans le lysosome pour sa dégradation (Kaushik *et al.*, 2012).

#### La microautophagie

La microautophagie permet l'entrée directe des composants cellulaires à dégrader dans le lysosome grâce à une invagination de la membrane lysosomale qui va former un tube autophagique entourant une partie du cytosol. Une vésicule va se former à l'extrémité du tube



**Figure 15 : Les 3 principaux types d'autophagie**

L'autophagie conduit à la dégradation du matériel cellulaire au sein des lysosomes. Il en existe 3 types principaux : la macroautophagie caractérisée par la formation de vésicules à double membrane appelés autophagosomes, la microautophagie où les constituants cellulaires sont directement incorporés au lysosome grâce à l'invagination de sa membrane et l'autophagie impliquant des protéines chaperonnes (« Chaperone-mediated autophagy ») comme Hsc70 (Heat shock cognate protein) qui se lie au motif KFERQ au sein de la protéine cible et à Lamp2A qui permet la translocation de cette protéine dans la lumière du lysosome où elle y sera dégradée. Adapté de (Boya *et al.*, 2013).

et bourgeonner dans la lumière du lysosome où elle sera dégradée par les enzymes lysosomales (Li *et al.*, 2012).

### La macroautophagie

La macroautophagie, plus simplement appelée autophagie, est un phénomène courant se produisant dans tous les types cellulaires. Ce type d'autophagie fait intervenir des vésicules à deux membranes dans lesquelles sont séquestrés les éléments à dégrader. L'étape initiale est caractérisée par une structure appelée phagophore qui va englober le matériel cellulaire à dégrader. Il peut être issu de différentes structures cellulaires comme le réticulum endoplasmique (RE) (Axe *et al.*, 2008), l'appareil de Golgi (Yen *et al.*, 2010) ou la membrane plasmique (Ravikumar *et al.*, 2010). Il s'en suit une expansion de la membrane pour former une structure sphérique à double membrane appelée autophagosome. L'autophagosome va alors fusionner avec des endosomes et/ou des lysosomes pour donner successivement un amphisome puis un autolysosome (Klionsky *et al.*, 2013, Feng *et al.*, 2014).

#### **1.2.6.2 L'autophagie sélective**

L'autophagie représente en général une dégradation non spécifique des composants cellulaires pour satisfaire ses besoins en énergie. Cependant, une autophagie sélective permet de cibler des composants spécifiques à dégrader au cours du développement ou d'une infection par exemple. La dégradation spécifique des agrégats protéiques (aggréphagie), des mitochondries (mitophagie), des ribosomes (ribophagie) ou des lipides (lipophagie) font partie des nombreux types d'autophagie sélective. La mitophagie intervient notamment au cours de la maturation érythroïde (Schweers *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2008). L'autophagie sélective fait intervenir différents récepteurs SAR (selective autophagy receptor) qui ciblent spécifiquement les composants à dégrader (Farre *et al.*, 2016). Les SAR possèdent en général dans leur structure un domaine de liaison à l'ubiquitine et un domaine LIR (LC3-interacting region) qui permet la liaison avec les protéines de la famille Atg8 comme LC3 ou GABARAPL1 (Kim *et al.*, 2016). Les SAR, dont font partie les protéines SQSTM1/p62 ou Nix, diffèrent en fonction du type d'autophagie sélective. SQSTM1/p62 intervient dans la dégradation de substrats ubiquitinylés. Nix, qui ne possède pas de domaine de liaison à l'ubiquitine, est essentiellement lié à la mitophagie notamment dans le cadre de la maturation érythroïde (Schweers *et al.*, 2007, Novak *et al.*, 2010, Johansen *et al.*, 2011).

### 1.2.6.3 Les mécanismes moléculaires de l'autophagie

La macroautophagie intervient souvent en réponse à un stress environnemental comme un manque de nutriments, un stress oxydant ou une hypoxie et va avoir pour effet de favoriser la survie de la cellule. Lorsque ce phénomène est dérégulé ou excessif, il peut au contraire conduire à la mort cellulaire. La macroautophagie comporte plusieurs étapes-clé : la formation du phagophore, « l'encapsulation » des produits à dégrader, la maturation de l'autophagosome, la fusion avec le lysosome et la dégradation de son contenu. Chacune de ces étapes est régulée par des protéines Atg (Autophagy-related proteins) qui ont été découvertes initialement chez la levure mais possèdent des homologues chez l'Homme (Feng *et al.*, 2014).

#### AMPK et mTOR

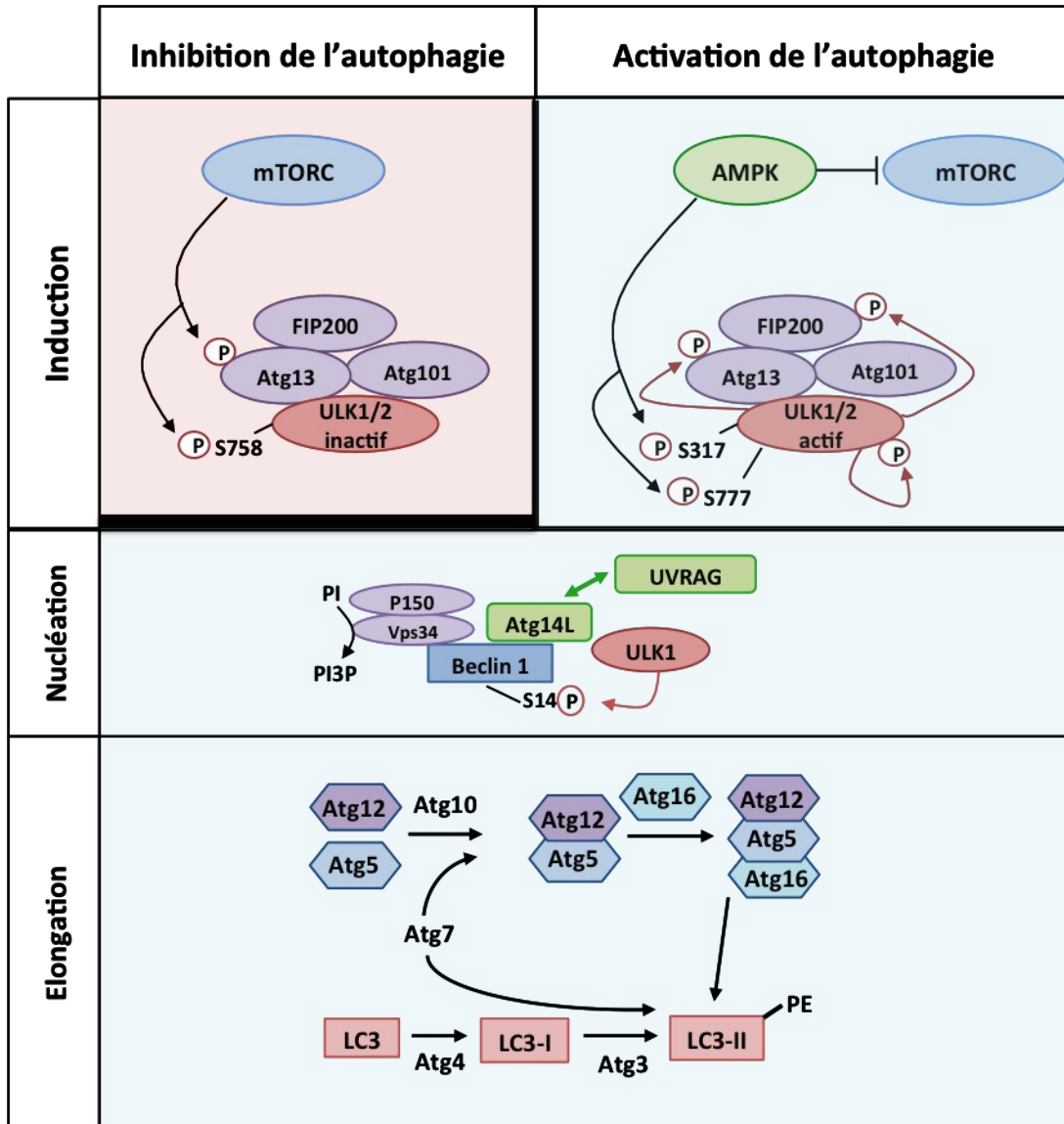
L'autophagie est un phénomène très complexe, dont les deux régulateurs majeurs sont mTOR (mammalian target of rapamycin) et AMPK (5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase) (Akers *et al.*, 2012). La protéine mTOR est une sérine/thréonine kinase qui interagit avec de nombreux partenaires pour former des complexes protéiques tels que mTORC (mammalian target of rapamycin complex) 1 et 2. Les protéines mTOR, Deptor (DEP-domain containing mTOR interacting protein) et mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8) sont communes aux deux complexes. Les protéines Raptor (sensible à la rapamycine) et PRAS40 (Proline-rich Akt substrate) sont spécifiques de mTORC1 alors que les protéines Rictor (insensible à la rapamycine), Protor et mSIN1 sont spécifiques de mTORC2 (Kim *et al.*, 2002, Sarbassov *et al.*, 2004, Laplante *et al.*, 2009). AMPK est activée par l'adénosine monophosphate (AMP) dans des conditions où la cellule a peu d'énergie et est inhibée en présence d'ATP contrairement à mTORC (Hardie, 2007). Ainsi, mTORC1 et AMPK vont réguler l'activité de la sérine/thréonine kinase ULK (UNC-51 like kinase) 1 avec des effets opposés. En effet, l'AMPK envoie des signaux inducteurs de l'autophagie en inhibant mTOR *via* la phosphorylation de Raptor alors que mTORC a un effet inhibiteur sur l'autophagie (Noda *et al.*, 1998, Gwinn *et al.*, 2008).

#### Le complexe ULK1

La kinase ULK1 (homologues de Atg1 chez la levure) appartient à un complexe protéique composé des protéines Atg13, FIP200 (FAK family-interacting protein 200 kDa) et Atg101 qui empêchent la dégradation d'Atg13 par le protéasome (Hara *et al.*, 2008, Mercer *et al.*, 2009). ULK1 peut s'associer avec AMPK ou mTORC par interactions directes (Hosokawa *et*

*al.*, 2009). AMPK active l'autophagie par phosphorylation de ULK1 sur les résidus sérines S317 et S777 alors que mTOR, lorsqu'il est actif, empêche l'activation de Atg13 et de ULK1 par sa phosphorylation sur le résidu sérine S758 (équivalent de la sérine 757 chez la souris). Cette modification empêche la liaison avec AMPK et inhibe son activité kinase (Ganley *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2011a). Une fois activé, ULK1 s'auto-phosphoryle et phosphoryle ses partenaires FIP200 et Atg13 en S355 permettant son recrutement au niveau de la membrane pré-autophagosomale (Figure 16) (Jung *et al.*, 2009). De plus, ULK1 contrôle la redistribution de la protéine membranaire Atg9 dans la cellule essentielle à l'induction de l'autophagie, d'une position proche du noyau au réseau trans-Golgien et aux endosomes tardifs (Young *et al.*, 2006, Reggiori *et al.*, 2012, Zavodszky *et al.*, 2013).





**Figure 16 : Les mécanismes moléculaires de l'autophagie**

TORC et AMPK sont les principaux régulateurs de l'initiation de l'autophagie. mTORC agit comme inhibiteur de l'autophagie en phosphorylant Atg13 et la kinase ULK1/2 au niveau de la sérine 758 (S758) la rendant inactive. Alors que l'AMPK phosphoryle ULK1/2 au niveau de deux autres sérines (S317 et S777) conduisant à son activation, son auto-phosphorylation et à la phosphorylation de FIP200 et Atg13. ULK phosphoryle beclin 1 au niveau de la sérine 14. Beclin 1 forme un complexe avec la PI3K de classe III vps34/p150 puis séquentiellement avec Atg14L et UVRAG pour permettre la nucléation et la maturation de l'autophagosome qui est également permise grâce aux systèmes de conjugaison Atg5/Atg12 et LC3. Adapté de (Jung *et al.*, 2009). P : Phosphorylation, mTORC : Mammalian target of rapamycin complex, AMPK : 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase, ULK : UNC-51 like kinase, FIP200 : FAK family-interacting protein 200, Vps34 : Vacuolar protein sorting 34, UVRAG:UV radiation resistance associated gene, PE : Phosphatidyléthanolamine

### Le complexe PI3K de classe III

Le complexe PI3K de classe III intervient à différentes étapes de l'autophagie mais est notamment essentiel à son initiation. Les PI3K de classe III sont composées d'une sous-unité régulatrice p150 (homologue de Vps15) et d'une sous-unité catalytique Vacuolar protein sorting 34 (Vps34) qui va catalyser la formation de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) à partir de phosphatidylinositol (PI). Les PI3K de classe III sont associées à la protéine beclin 1. En fonction des protéines recrutées par beclin 1, Vps34-p150 va interagir avec divers partenaires pour former différents complexes régulant l'autophagie. Le complexe Vps34-p150-beclin 1- Atg14 like (Atg14L) est essentiel à l'autophagie et intervient dans les stades précoces de la formation de l'autophagosome après phosphorylation de beclin 1 par ULK1 au niveau de la sérine 14 (Itakura *et al.*, 2008, Russell *et al.*, 2013). La protéine Atg14L peut être remplacée par UVRAG (UV radiation resistance associated gene) de manière mutuellement exclusive pour former un complexe Vps34-p150-beclin 1-UVRAG qui intervient dans la voie endocytaire et dans la maturation de l'autophagosome (Liang *et al.*, 2008, Proikas-Cezanne *et al.*, 2011). D'autres protéines qui se lient à beclin 1, comme Ambra1 et VMP1 (Vacuole membrane protein 1), ont des effets positifs sur la formation de l'autophagosome (Fimia *et al.*, 2007, Ropolo *et al.*, 2007). Par exemple, dans des conditions basales, beclin 1, Ambra1 et Vps34 sont liées à des chaînes de dynéine. Après induction de l'autophagie, ULK1 va phosphoryler Ambra1 et permettre le relargage du complexe et sa translocation au niveau du réticulum endoplasmique (RE) (Di Bartolomeo *et al.*, 2010). D'autres protéines comme Rubicon (RUN domain protein as beclin 1 interacting and cysteine rich containing) vont réguler négativement l'autophagie (Matsunaga *et al.*, 2009). En effet, Rubicon se lie à UVRAG, inhibe l'activité PI3K de Vps34 et donc l'autophagie (Sun *et al.*, 2011). En dehors de l'action des kinases et des complexes protéiques, l'autophagie peut être régulée par les protéines recrutées par beclin 1, par des FT tels que E2F et NF- $\kappa$ B ou des miR qui régulent l'expression de beclin 1, ainsi que par des modifications post-traductionnelles comme l'acétylation de beclin 1 par l'acétyltransférase p300 (Kang *et al.*, 2011, Sun *et al.*, 2015). Les PI3P formés par Vps34 génèrent des structures appelées PAS (structures pré-autophagosomales) permettant le recrutement de protéines importantes pour la formation de l'autophagosome comme les protéines de la famille WIPI (WD-repeat protein interactin with phosphoinositides) (Noda *et al.*, 2010). La famille de protéines WIPI compte 4 membres dont 2 jouent un rôle essentiel dans l'autophagie : WIPI 1 et 2 (Proikas-Cezanne *et al.*, 2015).

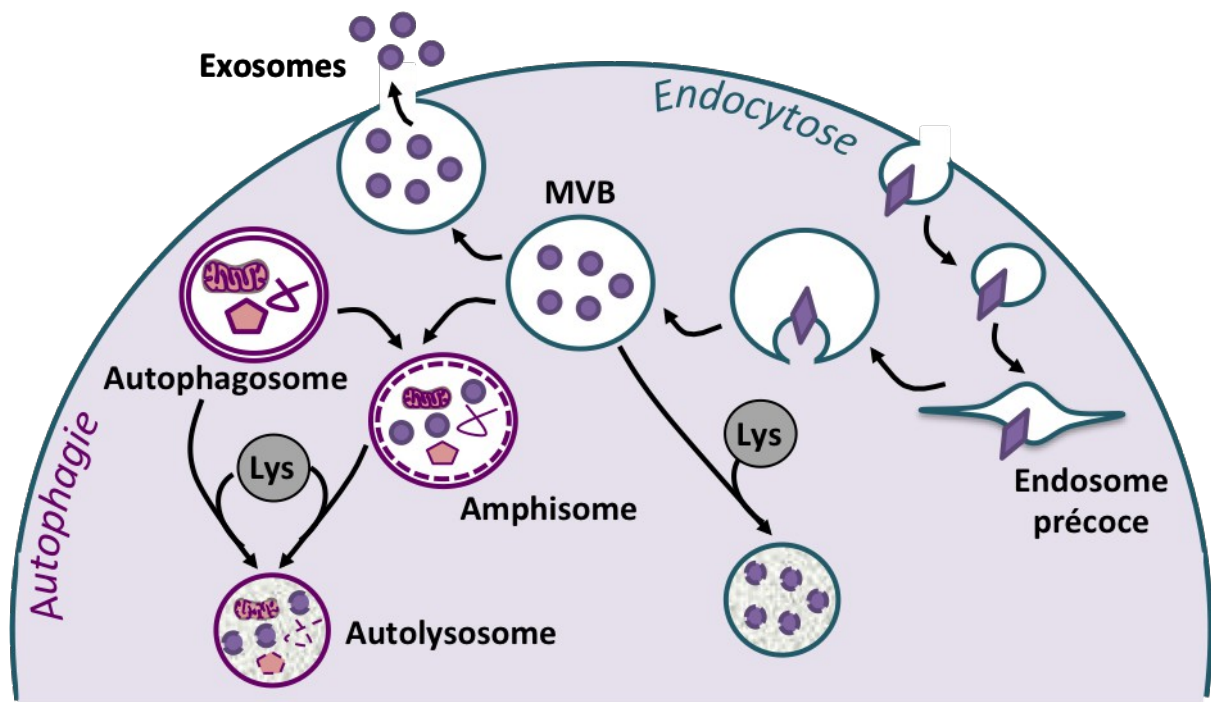
### Les systèmes de conjugaison Atg5-Atg12 et LC3

Les protéines WIPI jouent le rôle d'intermédiaires entre les PI3P et les 2 systèmes de conjugaison requis pour l'expansion et la fermeture du phagophore : les systèmes Atg5-Atg12 et LC3 (Figure 16) (Polson *et al.*, 2010, Mauthe *et al.*, 2011). Les protéines Atg5 et 12 sont associées de manière covalente par une réaction catalysée successivement par Atg7 et Atg10 puis s'associent à Atg16L (Mizushima *et al.*, 1998). Les protéines WIPI permettent le recrutement d'Atg16L et donc du complexe Atg5-Atg12 au niveau de la membrane autophagosomale sous forme d'un complexe tétramérique (Dooley *et al.*, 2014). LC3 appartient à la famille des homologues d'Atg8 chez la levure comme les protéines GABARAP (Gamma-aminobutyric acid receptor associated protein), GABARAPL1 (Gamma-aminobutyric acid receptor associated protein like 1) et GABARAPL2 (Gamma-aminobutyric acid receptor associated protein like 2) appelé également GATE-16 (Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa) qui sont plutôt impliquées dans la nucléation, le trafic vésiculaire et la fermeture de l'autophagosome (Le Grand *et al.*, 2011, Alemu *et al.*, 2012, Schaaf *et al.*, 2016). LC3 est clivé par Atg4 entraînant l'exposition d'un résidu glycine en C-terminal. La forme clivée de LC3 obtenue, appelée LC3-I, va être conjuguée à la phosphatidyléthanolamine (PE) au niveau de la glycine par l'action séquentielle d'Atg7, Atg3 et du complexe Atg5-Atg12-Atg16 pour former LC3-PE également appelé LC3-II (Fujita *et al.*, 2008, Otomo *et al.*, 2013, Dooley *et al.*, 2014, Lee *et al.*, 2016). Le niveau de LC3-II est corrélé avec le nombre d'autophagosomes dans la cellule du fait qu'il se lie au niveau de la membrane du phagophore. Une fois l'autophagosome formé, le complexe Atg5-Atg12-Atg16 se dissocie de la membrane et LC3-II restant du côté externe de la membrane autophagosomale est clivé par Atg4 puis recyclé alors que LC3-II présent du côté interne va être dégradé par autophagie (Mehrpour *et al.*, 2010).

### Fusion et dégradation

Une fois formé, l'autophagosome peut directement fusionner avec les lysosomes mais également avec des vésicules impliquées dans le trafic endosomal, notamment les MVB (Multivesicular bodies) formant ainsi des structures hybrides appelées amphisomes qui fusionneront également avec les lysosomes (Gordon *et al.*, 1988, Berg *et al.*, 1998). Les MVB sont impliqués dans la dégradation de protéines endocytées comme le récepteur à la transferrine et sont caractérisés par la présence de vésicules intraluminales (ILV) appelés également exosomes (Metcalf *et al.*, 2010, Tachiyama *et al.*, 2011). Les MVB peuvent être

dirigés vers la membrane plasmique conduisant au relargage d'exosomes dans le milieu extracellulaire ou vers les vésicules autophagiques pour fusionner avec les autophagosomes (Figure 17). Des MVB fonctionnels sont nécessaires pour une autophagie efficace (Filimonenko *et al.*, 2007). De plus, une induction de l'autophagie ou une surexpression de LC3 inhibe le relargage d'exosomes et des modulateurs de l'autophagie régulent la formation des MVB ainsi que le relargage des exosomes montrant la convergence entre les voies de l'autophagie et les voies endocytaires notamment dans le cadre de la maturation érythroïde (Fader *et al.*, 2005, Fader *et al.*, 2008, Amaya *et al.*, 2015). Ainsi, ces deux phénomènes cellulaires possèdent des acteurs moléculaires communs comme les complexes protéiques ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport) qui recrutent et délivrent les protéines endocytées aux ILV des MVB mais jouent également un rôle dans la fusion MVB/lysosome et MVB/autophagosome (Bache *et al.*, 2006, Filimonenko *et al.*, 2007, Rusten *et al.*, 2007, Urwin *et al.*, 2010). De la même manière, un certain nombre de protéines de la famille Rab ont un rôle dans l'autophagie. Rab11, est impliqué dans le recyclage du récepteur à la transferrine et intervient également au niveau de la fusion autophagosome/MVB alors que Rab7 est plutôt impliqué dans la fusion autophagosome/lysosome (Ullrich *et al.*, 1996, Ren *et al.*, 1998, Gutierrez *et al.*, 2004, Fader *et al.*, 2008, Hyttinen *et al.*, 2013). Les protéines de la famille SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) interviennent également dans les événements de fusion membranaire et sont classées en deux groupes : les v-SNARE (vesicle-associated membrane SNARE) localisés au niveau de la membrane donneuse et les t-SNARE (target-associated membrane SNARE) localisés au niveau de la membrane acceptrice. Parmi ces protéines, VAMP3 et VAMP7 (Vesicle-associated membrane protein 3/7) sont impliquées dans la fusion autophagosome/lysosome et amphisome/lysosome (Fader *et al.*, 2009, Amaya *et al.*, 2015, Nakamura *et al.*, 2017). De plus, comme décrit précédemment, les complexes protéiques formés par beclin 1 et ses différents partenaires régulent différentes étapes de l'autophagie. La liaison de la protéine Rubicon au complexe inhibe l'autophagie *via* la modulation de l'activité PI3K de Vsp34 mais également en régulant négativement le trafic vésiculaire et la fusion autophagosome/lysosome (Matsunaga *et al.*, 2009, Zhong *et al.*, 2009, Sun *et al.*, 2011). Les protéines endosomales/lysosomales comme les protéines LAMP1 et 2 sont également responsables de la fusion autophagosome/endosome tardif/lysosome. En effet, chez des souris et des cellules déficientes pour LAMP1 et 2, on peut observer une accumulation massive d'autophagosomes dans différents tissus due à l'inhibition de la fusion



**Figure 17 : Convergence entre les voies de l'autophagie et de l'endocytose**

Au cours de l'autophagie, les éléments cellulaires à dégrader sont entourés par une double membrane formant un autophagosome. L'autophagosome peut fusionner avec un multivesicular body (MVB) issu de l'endocytose. Le produit de la fusion autophagosome/MVB est appelé amphisome. L'autophagosome ou l'amphisome fusionnent avec le lysosome conduisant à la dégradation de la membrane interne de l'autophagosome et de son contenu. Adapté de (Fader *et al.*, 2008).

avec les lysosomes (Tanaka *et al.*, 2000, Eskelinen *et al.*, 2002, Huynh *et al.*, 2007, Saftig *et al.*, 2008). Après la fusion avec le lysosome, le contenu de l'autophagosome/amphisome est dégradé par les hydrolases lysosomales qui sont actives à pH acide. Le maintien d'un pH acide au sein du lysosome est permis grâce à des pompes à protons appelées v-ATPase (Vacuolar-ATPase). Les v-ATPases sont requises pour les étapes finales de l'autophagie (Nakamura *et al.*, 1997). La bafilomycine A1 est un inhibiteur des phases tardives de l'autophagie qui agit *via* l'inhibition des v-ATPases et empêche l'acidification ou en affectant la fusion autophagosome/endosome/lysosome (Yamamoto *et al.*, 1998, Fass *et al.*, 2006, Mijaljica *et al.*, 2011). Elle est couramment utilisée pour visualiser les protéines dégradées par autophagie comme LC3 et p62 (Katsuragi *et al.*, 2015, Klionsky *et al.*, 2016).

#### **1.2.6.4 L'autophagie et les cellules souches hématopoïétiques**

L'autophagie est impliquée dans de nombreux processus physiologiques comme le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire ou pathologiques lors d'infections, de cancers ou de maladies neurodégénératives (Jiang *et al.*, 2014). Les CSH ont un haut potentiel d'induction d'autophagie. En effet, les progéniteurs les plus immatures (CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>) présentent un flux autophagique plus élevé que les cellules CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> et que les cellules différenciées. Une inhibition de l'autophagie dans ces cellules diminue la quantité de CSH, leur capacité d'auto-renouvellement et induit l'apoptose (Gomez-Puerto *et al.*, 2016). L'autophagie est également essentielle à la quiescence des CSH. En effet, leur localisation au niveau de la région hypoxique de la niche hématopoïétique nécessite une faible activité mitochondriale. A l'inverse, l'activation des CSH est accompagnée par une augmentation de la masse mitochondriale pour leur prolifération et leur différenciation. Le contrôle du contenu cellulaire des CSH en mitochondries est dépendant d'AKT et mTOR et fait intervenir l'autophagie (Simsek *et al.*, 2010, Joshi *et al.*, 2013, Vannini *et al.*, 2016, Ho *et al.*, 2017). L'autophagie est également impliquée dans la survie cellulaire des CSH en réponse à un stress métabolique (Warr *et al.*, 2013). De plus, l'autophagie est essentielle pour l'activité des CSH. En effet, une transplantation de CSH Atg7<sup>-/-</sup> chez un hôte irradié rend impossible la reconstitution hématopoïétique à long terme. D'autre part, une délétion conditionnelle d'Atg7 chez la souris au niveau du système hématopoïétique conduit à une diminution du nombre de CSH et des progéniteurs ainsi qu'une prolifération myéloïde anormale conduisant à une anémie, une splénomégalie et une lymphadénopathie (Mortensen *et al.*, 2011a, Mortensen *et al.*, 2011b). En revanche, le rôle de l'autophagie dans la détermination du destin cellulaire des CSH n'est pas connu.

### 1.2.6.5 L'autophagie et la maturation érythroïde

Kent *et al.*, ont décrit la présence de vésicules d'autophagie au niveau des érythrocytes et suggèrent que l'autophagie est impliquée dans la maturation érythroïde (Kent *et al.*, 1966). Lors de l'érythropoïèse, l'autophagie est induite au stade polychromatophile et permet l'élimination de tous les organites cellulaires (mitochondries, ribosomes,...) ainsi que du noyau pour former un érythrocyte mature (Simpson *et al.*, 1967, Betin *et al.*, 2013). Le blocage de l'expulsion des autophagolysosomes conduit à la formation de cellules érythroïdes de morphologie anormale et provoque l'anémie chez la souris suggérant le rôle important de l'autophagie pour la maturation érythroïde (Holm *et al.*, 2002). De plus, il a été montré que les patients atteints d'anémie aplasique présentent des cellules CD34<sup>+</sup> dans lesquelles l'autophagie est défectueuse en comparaison avec des cellules isolées à partir de sujets sains (Huang *et al.*, 2016). Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées *in vitro* par de l'Epo recombinante ainsi que les cellules érythroleucémiques K562 induites par de l'hémine présentent de l'autophagie (Zhang *et al.*, 2009, Betin *et al.*, 2013, Fader *et al.*, 2016). Wang *et al.*, ont également mis en évidence l'induction de la mitophagie en réponse à l'hémine (Wang *et al.*, 2016a). En effet, le facteur de transcription nécessaire à l'érythropoïèse GATA-1, en association avec FOG-1, est capable d'activer la transcription des gènes impliqués dans l'autophagie et notamment dans la formation des autophagosomes tels que LC3, GABARAPL1 (Kang *et al.*, 2012). De plus, l'inhibition de certaines protéines impliquées dans l'autophagie comme ULK1, Atg4, Atg7 ou FIP200 sont capables d'empêcher le développement érythroïde et provoquer des anémies (Zhang *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2015a). En effet, Mortensen *et al.*, ont montré que l'inactivation du gène Atg7 au niveau des cellules hématopoïétiques empêche l'autophagie dans les cellules érythroïdes conduisant à une anémie chez la souris (Mortensen *et al.*, 2010). L'autophagie sélective est également un événement important pour l'érythropoïèse. Kundu *et al.*, ont utilisé des souris ULK1<sup>-/-</sup> pour montrer le rôle essentiel de ULK1 dans l'élimination des ribosomes et mitochondries pendant la différenciation érythroïde terminale (Kundu *et al.*, 2008). De la même manière, l'expression du récepteur sélectif de la mitophagie NIX est augmentée au cours de la différenciation érythroïde (Schweers *et al.*, 2007). Une délétion de NIX conduit à un défaut de maturation et une anémie chez la souris (Sandoval *et al.*, 2008).

### 1.2.6.6 L'autophagie et la granulopoïèse

A l'inverse de l'érythropoïèse, il n'existe pas d'évidence de l'importance de l'autophagie dans la différenciation granulocytaire car ce phénomène a été étudié jusqu'à présent sur des

lignées de LMA avec des résultats parfois contradictoires. En effet, il a été montré que l'induction de la différenciation des cellules de LMA (NB4, HL60, U937) par l'ATRA ou le Dasatinib est corrélée avec une induction de l'autophagie dans ces cellules. L'inhibition de l'autophagie avec la 3-méthyladénine, la chloroquine ou des si/shARN ciblant certaines protéines de l'autophagie comme Atg7 ou WIPI empêche la différenciation dans les différents modèles. A l'inverse, des inducteurs de l'autophagie comme la rapamycine agissent en synergie avec le traitement différenciant et favorisent la différenciation (Brigger *et al.*, 2014, Xie *et al.*, 2014, Orfali *et al.*, 2015). De plus, la transcription du gène codant la protéine MAP1S qui permet la liaison des autophagosomes aux microtubules est régulée par la facteur de transcription PU.1 dans le cadre de la différenciation des cellules NB4 par l'ATRA (Haimovici *et al.*, 2014). Riffelmacher *et al.*, ont également montré le rôle de l'autophagie et notamment de la lipophagie dans la différenciation neutrophile normale chez la souris (Riffelmacher *et al.*, 2017). Cependant, d'autres inducteurs de la différenciation tel que le chlorure de cobalt, affectent le flux autophagique des cellules NB4 et U937 et la combinaison avec un inhibiteur de l'autophagie comme la chloroquine ou l'utilisation d'un shARN (small hairpin) anti-Lamp renforce l'effet du chlorure de cobalt sur la différenciation (Yan *et al.*, 2013). De plus, Rozman S. *et al.*, ont montré que l'activité autophagique est inversement corrélée à la différenciation neutrophile chez la souris et montrent une augmentation de la prolifération et une différenciation accélérée des neutrophiles *via* l'activation de p38 et mTORC1 dans des CSH de souris Atg5<sup>-/-</sup> (Rozman *et al.*, 2015).

#### **1.2.6.7 L'autophagie et la différenciation macrophagique**

Le rôle de l'autophagie dans la différenciation des CSH en monocytes est peu renseigné mais l'autophagie ne semble pas impliquée dans cette étape car son niveau dans les progéniteurs myéloïdes est très faible et l'extinction de l'expression des gènes codant les protéines de l'autophagie entraîne une myéloprolifération *in vivo* (Mortensen *et al.*, 2011a, Mortensen *et al.*, 2011b, Warr *et al.*, 2013, Gomez-Puerto *et al.*, 2016). En revanche, l'autophagie est essentielle à la différenciation monocyte-macrophage. En effet, l'autophagie est activée pendant la différenciation de monocytes humains induits par le M-CSF et la différenciation monocyte-macrophage est inhibée chez des monocytes de souris Atg7<sup>-/-</sup> (Jacquel *et al.*, 2012). De plus, l'inhibition de l'autophagie par la 3-MA, la chloroquine ou un siARN beclin 1 bloque la différenciation induite par le GM-CSF et induit la mort des monocytes (Zhang *et al.*, 2012).



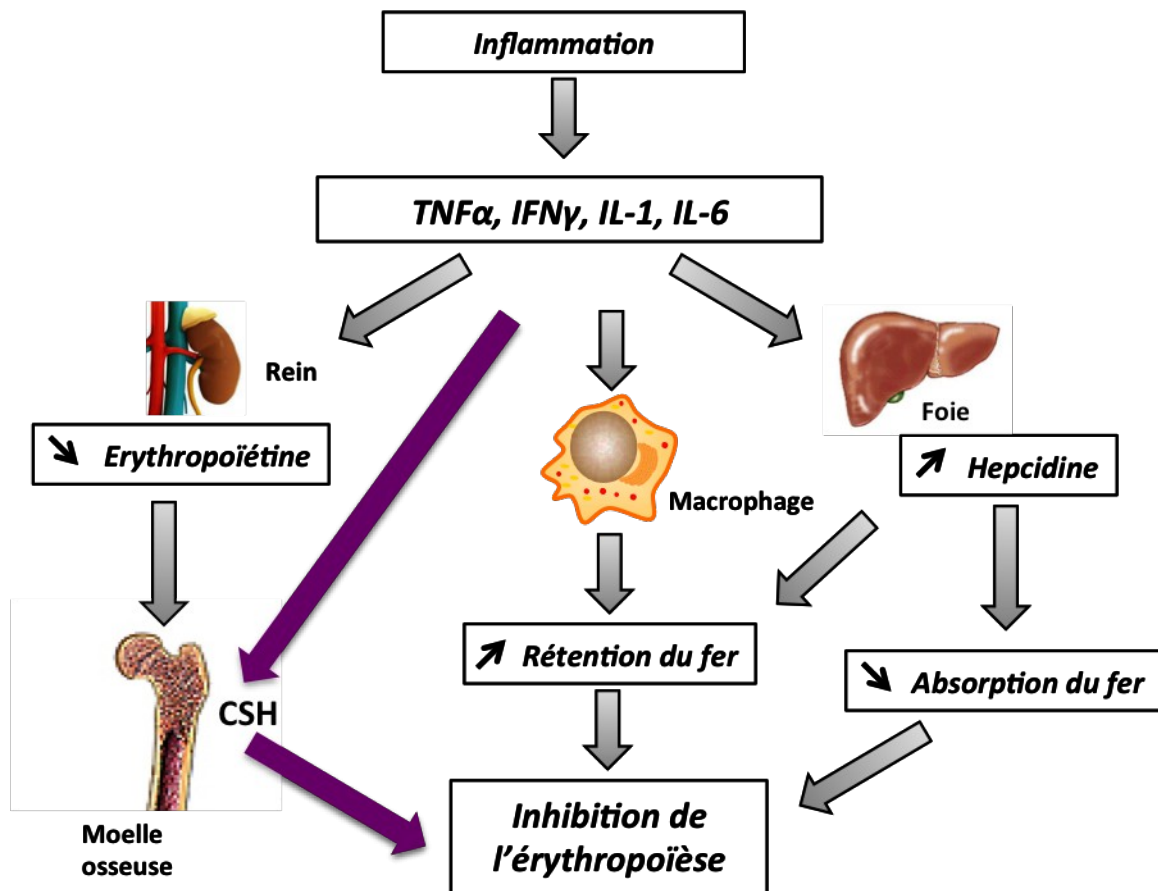
## 1.3 Le TNF $\alpha$

### 1.3.1 Cytokines pro-inflammatoires et anémie

L'anémie est une complication fréquente chez les patients atteints de cancers ou de maladies inflammatoires chroniques et est notamment due à la production importante et continue de cytokines pro-inflammatoires. En effet, certaines cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$ , l'interféron  $\gamma$  (INF $\gamma$ ), TRAIL, L'IL-1, l'IL-6 et l'IL-10 sont impliquées dans l'inhibition de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs érythroïdes *in vitro* et *in vivo* (Blick *et al.*, 1987, Johnson *et al.*, 1989, Moldawer *et al.*, 1989, Means *et al.*, 1992, Dai *et al.*, 1998, Zamai *et al.*, 2000, Tilg *et al.*, 2002, Ek *et al.*, 2005, Morceau *et al.*, 2009, McCranor *et al.*, 2014). L'anémie de l'inflammation est multifactorielle et les cytokines pro-inflammatoires vont intervenir au niveau de différents organes (de Oliveira Junior *et al.*, 2015). L'IL-6 intervient au niveau du foie où elle favorise la libération d'hepcidine (Nemeth *et al.*, 2004a). Cette hormone est généralement sécrétée lors d'un surplus de fer, elle empêche l'absorption intestinale du fer et inhibe la ferroportine (Nemeth *et al.*, 2004b). La ferroportine est une protéine trans-membranaire responsable du transfert du fer dans la circulation, son inhibition conduit donc à une rétention du fer dans les cellules. L'INF $\gamma$  est également responsable d'une diminution de l'expression de cette protéine (Byrd *et al.*, 1993). Ensemble, ces cytokines diminuent la disponibilité du fer au niveau de la moelle osseuse favorisant l'anémie. De plus, le TNF $\alpha$  et l'INF $\gamma$  peuvent inhiber la production d'Epo au niveau du rein empêchant ainsi l'induction de l'érythropoïèse (Faquin *et al.*, 1992, Vannucchi *et al.*, 1994, Frede *et al.*, 1997, Jelkmann, 1998). Au niveau cellulaire, le TNF $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-10 induisent l'expression de la protéine de stockage du fer, la ferritine, favorisant la rétention du fer dans les cellules (Wei *et al.*, 1990, Miller *et al.*, 1991, Kobune *et al.*, 1994, Tilg *et al.*, 2002). Enfin, d'autres études ont également montré l'action directe de ces cytokines et notamment du TNF $\alpha$  sur les CSH bloquant ainsi le développement érythroïde (Figure 18) (Rusten *et al.*, 1995, Morceau *et al.*, 2006, Buck *et al.*, 2008, Buck *et al.*, 2009).

### 1.3.2 La superfamille du TNF

Parmi les cytokines responsables d'anémies, nous nous sommes intéressés à un membre de la superfamille du TNF (Tumor Necrosis Factor), le TNF $\alpha$ . Les ligands de la superfamille du TNF comprennent 27 membres retrouvés sous forme d'homotrimères non covalents (Bremer, 2013). Ces ligands se fixent à leurs récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF (TNFR), qui forment également des trimères, pour réguler la mort cellulaire, la



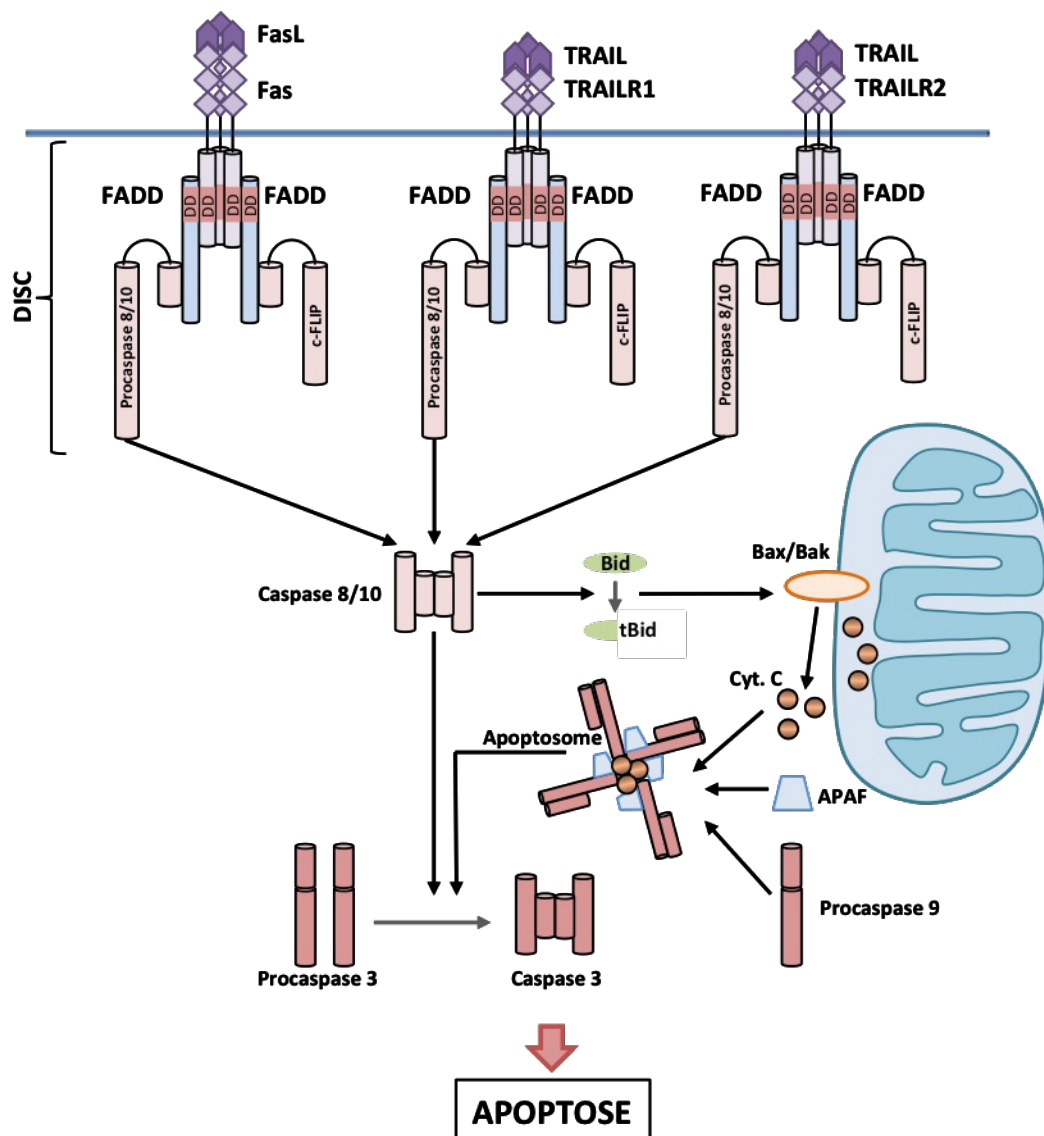
**Figure 18 : Cytokines pro-inflammatoires et anémie**

Les patients atteints de cancer ou de maladies inflammatoires chroniques présentent des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires comme le  $TNF\alpha$ , l'interféron  $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ) et les interleukines 1 et 6 ( $IL-1$ ,  $IL-6$ ) qui peuvent perturber l'érythropoïèse d'une part en inhibant la synthèse d'érythropoïétine par le rein, d'autre part en induisant la synthèse d'hepcidine qui conduit à une augmentation de la rétention du fer par les cellules et une diminution de son absorption au niveau intestinal mais ces cytokines peuvent agir directement au niveau de la moelle osseuse sur les cellules souches hématopoïétiques (CSH) où elles empêchent la différenciation érythroïde conduisant à des anémies.

prolifération, la différenciation, la production de cytokines et les processus d'inflammation (Guicciardi *et al.*, 2009). Certains de ceux qui sont impliqués dans la mort cellulaire, forment un sous-groupe appelé récepteurs de mort (DR pour death receptor) caractérisés par un domaine de mort (DD pour death domain). Le TNF, FasL et TRAIL représentent les ligands des récepteurs de mort les plus étudiés. Malgré leur dénomination, ces récepteurs possèdent également des fonctions non-apoptotiques dans les processus d'inflammation et de différenciation. Une fois activés, ils vont recruter des protéines adaptatrices qui contiennent également un DD formant un grand complexe protéique qui régule différentes voies de signalisation (Sessler *et al.*, 2013). Il existe deux groupes de récepteurs de mort. Le premier comprend les récepteurs Fas, TRAILR (TRAIL receptor) 1 et TRAILR2 qui recrutent un complexe appelé DISC (Death-inducing signaling complex) identique pour les 3 récepteurs, composé de FADD, FLIP (FLICE-inhibitory protein) et des pro-caspases 8 et 10 conduisant à l'activation de la caspase 3 et à la transduction du signal apoptotique (Figure 19). L'autre groupe comprend le TNFR1, DR3, DR6 et EDAR (Ectodysplasin A receptor) qui recrutent des molécules différentes induisant également des signaux d'apoptose et de survie (cf § 1.3.4 Les voies de signalisation du TNF $\alpha$ ) (Lavrik *et al.*, 2005).

### 1.3.3 Le TNF $\alpha$ et les thérapies anti-TNF $\alpha$

Le TNF $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans de nombreux processus biologiques comme la prolifération et la différenciation cellulaire, l'apoptose ou le métabolisme lipidique. Cette cytokine est produite principalement par les macrophages et les lymphocytes T mais aussi par d'autres types cellulaires (monocytes, adipocytes, cellules endothéliales) en réponse à des agents infectieux ou des stress externes comme des antigènes viraux, les lipopolysaccharides (LPS) bactériens ou d'autres cytokines comme l'IL-1, l'IFN $\gamma$  mais aussi le TNF $\alpha$  qui induit sa propre synthèse (von Fliedner *et al.*, 1992, Sewter *et al.*, 1999, van der Bruggen *et al.*, 1999, Imaizumi *et al.*, 2000, Wesemann *et al.*, 2003, Parameswaran *et al.*, 2010). Le TNF $\alpha$  joue un rôle clé dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), l'athérosclérose, le psoriasis, le sepsis, le diabète, l'obésité et les cancers (Parameswaran *et al.*, 2010). La mise en place des biothérapies anti-TNF $\alpha$  a révolutionné la prise en charge de nombreuses maladies inflammatoires et améliorent considérablement l'anémie de l'inflammation (Bergamaschi *et al.*, 2010, Corrado *et al.*, 2017). Il existe différents types d'antagonistes du TNF $\alpha$  sous forme de récepteur soluble



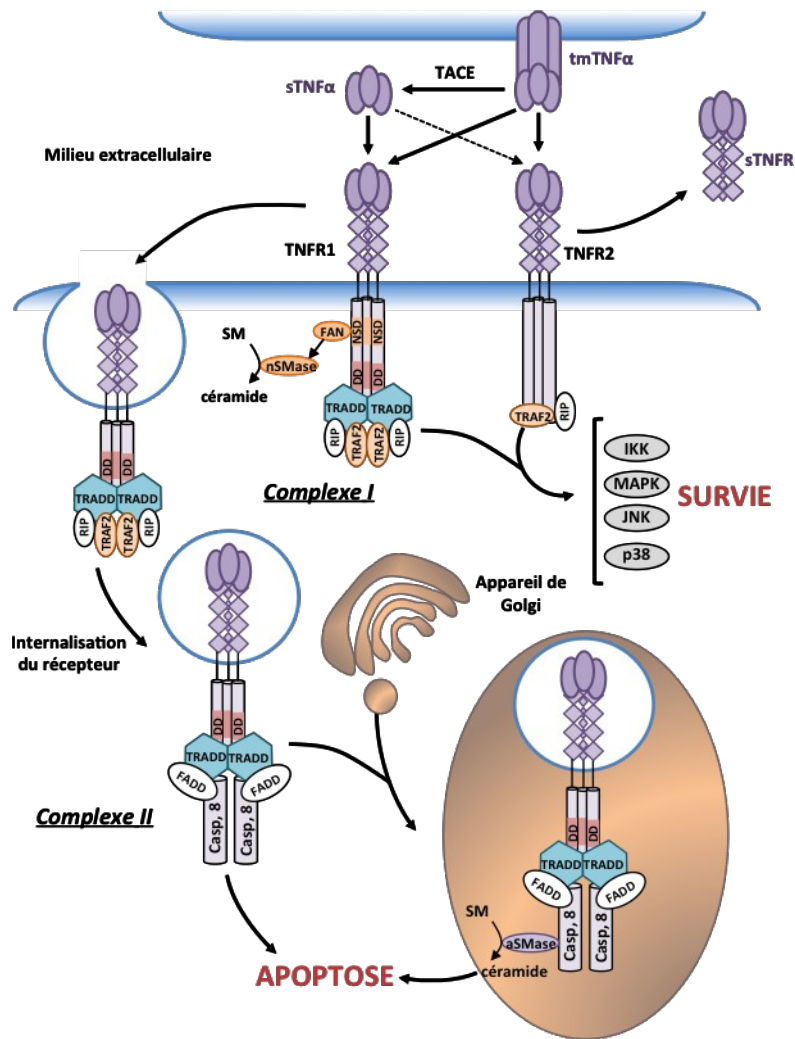
**Figure 19 : Induction de l'apoptose par Fas, TRAILR1 et TRAILR2**

La liaison de FasL et TRAIL à leur récepteur respectif Fas, TRAILR1 et TRAILR2 conduit au recrutement de molécules adaptatrices possédant un domaine de mort (DD) comme FADD qui se lie aux procaspases 8/10 et les active. Les caspases 8/10 vont activer directement les caspases effectrices pour induire l'apoptose. Les caspases 8/10 peuvent également cliver Bid donnant tBid. tBid active Bax et Bak qui vont former des canaux Bax/Bak permettant le relargage du cytochrome c. Le cytochrome c se lie à APAF et à la procaspase 9 pour former l'apoptosome qui va contribuer à l'activation des caspases effectrices et conduire à l'apoptose Adapté de (Lavrik *et al.*, 2005, Sessler *et al.*, 2013).

(Etanercept), de fragment Fab (Certolizumab) ou d'anticorps monoclonaux (Adalimumab, Infliximab, Golimumab). Cependant, ces traitements présentent certains effets secondaires. En effet, les traitements anti-TNF $\alpha$  augmentent le risque de maladies démyélinisantes (sclérose en plaque, névrite optique) (Kaltsonoudis *et al.*, 2014), le risque de réactivation de la tuberculose (Solovic *et al.*, 2010), du virus de l'hépatite B (HBV) (Tavakolpour *et al.*, 2016) ou du virus de l'herpès zoster (HZV) (Adelzadeh *et al.*, 2014). Chez les patients atteints d'un cancer, le TNF $\alpha$  joue à la fois un rôle dans la régression tumorale et un rôle promoteur de tumeur. En effet, d'une part le TNF $\alpha$  joue un rôle protecteur *via* la stimulation du système immunitaire et son activité cytotoxique mais joue également un rôle dans la croissance tumorale, le maintien de l'inflammation chronique et l'angiogenèse favorisant le développement de cancers (Mocellin *et al.*, 2005, Lebrech *et al.*, 2015). Ainsi, le TNF $\alpha$  est capable d'induire la mort de cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* chez la souris et a montré son efficacité dans certains type de cancers (sarcome, mélanome) dans le cas d'une administration locale (Balkwill *et al.*, 1986, Verhoef *et al.*, 2007). De la même manière, les thérapies anti-TNF $\alpha$  sont capables d'induire la mort de cellules cancéreuses *in vitro* et pourraient contrer l'anémie liée au cancer *in vivo* (Mitoma *et al.*, 2008). Les rôles contradictoires du TNF $\alpha$  rapportés par différentes études soulèvent encore la question de l'utilisation du TNF $\alpha$  ou des thérapies anti-TNF $\alpha$  dans le traitement des cancers.

#### **1.3.4 Les voies de signalisation du TNF $\alpha$**

Le TNF $\alpha$  est synthétisé sous forme d'un précurseur membranaire. Cette forme transmembranaire (tmTNF $\alpha$ ) est clivée par la protéase TNF $\alpha$ -converting enzyme (TACE) également appelée ADAM17 pour « a disintegrin and metalloproteinase 17 » pour libérer une forme soluble (sTNF $\alpha$ ) (Figure 20) (Black *et al.*, 1997). Ces deux formes du TNF $\alpha$  jouent un rôle dans la réponse inflammatoire. Plusieurs types de récepteurs au TNF (TNF-R) peuvent être spécifiquement activés par les deux formes de TNF $\alpha$ . En effet, le tmTNF $\alpha$  et le sTNF $\alpha$  sont capables de se lier au récepteur TNF-R1 alors que le tmTNF $\alpha$  est requis pour l'activation du TNF-R2 (Grell *et al.*, 1995). Ces récepteurs existent également sous forme soluble (sTNF-R1 et sTNF-R2) dans le milieu extracellulaire (Dri *et al.*, 2000). Ils proviennent des récepteurs membranaires clivés par la TACE afin d'atténuer les effets du TNF $\alpha$  par compétition avec les récepteurs membranaires ou de protéger le TNF $\alpha$  de la dégradation. La forme transmembranaire des récepteurs TNF-R1 et TNF-R2 contient un domaine extracellulaire qui permet la fixation du ligand et un domaine intracellulaire qui active la



**Figure 20 : Voies de signalisation du TNF $\alpha$**

Le TNF $\alpha$  existe sous forme transmembranaire (tmTNF $\alpha$ ) qui est clivé par la TNF $\alpha$ -converting enzyme (TACE) pour donner la forme soluble (sTNF $\alpha$ ). Le tmTNF $\alpha$  se fixe aux récepteurs du TNF $\alpha$  1 et 2 (TNF-R1/TNF-R2) alors que le sTNF $\alpha$  se fixe uniquement au TNF-R1. Les TNFR existent également sous forme soluble (sTNF-R). Le complexe TRADD (TNF-R1 associated death domain protein)/TRAF-2 (TNF receptor-associated factor 2)/RIP (Receptor interacting protein) est recruté au niveau du domaine de mort (DD) du TNF-R1 formant le complexe I. Le complexe I du TNF-R1 et le recrutement de TRAF-2 au niveau du TNF-R2 active des voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire comme IKK/NF- $\kappa$ B, MAPK, JNK et p38. Le TNF-R1 possède également un domaine NSD (neutral sphingomyelinase activating domain) qui recrute la protéine adaptatrice FAN (factor associated with neutral sphingomyelinase activation) activant la sphingomyélinase neutre (nSMase) et la formation de céramides. Le TNF-R1 peut également être internalisé et recruter le complexe II formé de TRADD, FADD (Fas-associated death domain) et de la caspase 8. L'ensemble peut fusionner avec des vésicules trans-golgiennes, activer la sphingomyélinase acide (aSMase) et la formation de céramides conduisant à l'apoptose. Adapté de (MacEwan, 2002, Schneider-Brachert *et al.*, 2004, Iordanov *et al.*, 2005, Schutze *et al.*, 2008).

transduction du signal. Après fixation du ligand, le récepteur se trimérise, conduisant au recrutement de protéines adaptatrices au niveau du domaine cytoplasmique du récepteur formant différents complexes (Li *et al.*, 2008). Le récepteur TNF-R1 possède un domaine de mort, qui lui permet d'interagir avec des protéines contenant le même motif telle que la protéine TRADD (TNF-R1 associated death domain protein). Une fois associée au récepteur, cette protéine va induire le recrutement de RIP-1 (Receptor interacting protein 1) et de TRAF-2 (TNF receptor-associated factor 2) formant le complexe I (Ermolaeva *et al.*, 2008). Le TNFR1 comporte également un domaine NSD (neutral sphingomyelinase activating domain) qui permet la liaison de la protéine adaptatrice FAN (factor associated with neutral sphingomyelinase activation) qui conduit à l'activation de la sphingomyélinase neutre (nSMase) et à la formation de céramides (Adam-Klages *et al.*, 1996). Contrairement au TNF-R1, TNF-R2 ne contient pas de DD et va directement interagir avec TRAF-2. Cette protéine commune à la signalisation *via* TNF-R1 et TNF-R2 conduit à l'activation de l'I $\kappa$ B kinase (IKK) et des MAPK-ERK, JNK (c-jun N-terminal kinase) et p38 dont le rôle est de maintenir l'inflammation, d'induire la prolifération et la survie cellulaire (Ermolaeva *et al.*, 2008). Puis le TNF-R1, TRADD et RIP sont modifiées et dissociés du récepteur et se lient à FADD ce qui conduit au recrutement de la caspase 8 (complexe II), son activation et l'induction de l'apoptose. Le TNF-R1 peut également être endocyté, fusionner avec les vésicules trans-golgiennes et activer la production de céramides par la sphingomyélinase acide et induire l'apoptose (Schneider-Brachert *et al.*, 2004, Schutze *et al.*, 2008).

### **1.3.5 Effets moléculaires du TNF $\alpha$ sur la différenciation érythroïde**

Johnson CS *et al.*, ont été les premiers à montrer l'effet inhibiteur du TNF $\alpha$  sur la formation de CFU-E en réalisant un test clonogénique sur des cellules de souris (Johnson *et al.*, 1988, Johnson *et al.*, 1989). L'administration de TNF $\alpha$  recombinant chez des patients atteints de cancer diminue la production d'Hb de manière significative (Blick *et al.*, 1987) alors que l'administration d'anti-TNF $\alpha$  améliore considérablement l'anémie de l'inflammation (Bergamaschi *et al.*, 2010, Corrado *et al.*, 2017). Cet effet a été confirmé dans différents modèles. En effet, Xiao W *et al.*, ont montré que le TNF $\alpha$  est capable de diminuer la production de la GPA dans des cellules CD34<sup>+</sup> induites par l'Epo (Blick *et al.*, 1987). De plus, Rusten LS *et al.*, ont mis en évidence l'implication du TNF-R1 dans l'inhibition de la formation de BFU-E (Rusten *et al.*, 1995). Il a également été montré au laboratoire LBMCC que le TNF $\alpha$  est capable d'inhiber la formation d'Hb dans les cellules K562 induites à se

différencier par l'Aclacinomycine A (Acla), ainsi que dans les cellules TF-1 et dans les cellules CSPH CD34<sup>+</sup> induites par l'Epo. De plus, le TNF $\alpha$  induit une diminution de l'expression de nombreux gènes érythroïdes comme la globine  $\gamma$ , l'EpoR, la GPA et la PBGD/HMBS (porphobilinogène déaminase/hydroxymethylbilane synthase). Le TNF $\alpha$  est aussi capable d'inhiber l'érythropoïèse en dérégulant la balance GATA-1/GATA-2. En effet, cette cytokine inhibe l'activité transcriptionnelle du facteur GATA-1, inducteur de la différenciation érythroïde, soit en inhibant son expression dans les cellules K562 induites par l'Acla et dans les cellules TF-1 induites par l'Epo, soit en favorisant l'interaction entre GATA-1 et son inhibiteur PU.1 dans les CSPH CD34<sup>+</sup>. D'autre part, le TNF $\alpha$  diminue l'interaction entre GATA-1 et son cofacteur FOG-1 par dégradation de celui-ci et induit une augmentation de l'expression du facteur inhibiteur GATA-2 (Morceau *et al.*, 2006, Buck *et al.*, 2008, Grigorakaki *et al.*, 2011). D'autres part, certaines voies de signalisation activées par le TNF $\alpha$  ont également été montrées comme inhibitrices de l'érythropoïèse. En effet, Liu JJ *et al.*, ont montré que le facteur NF- $\kappa$ B est capable d'inhiber l'expression des gènes érythroïdes (Liu *et al.*, 2003). De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de la MAPKp38, le SB203580 a permis de montrer le rôle potentiel de p38 dans l'inhibition de l'érythropoïèse par le TNF $\alpha$  dans les cellules TF-1 (Buck *et al.*, 2008). De plus, le TNF $\alpha$  est un inducteur important de la production des céramides en augmentant l'activité des sphingomyélinases (SMase). Or, les céramides semblent jouer un rôle dans la régulation de l'érythropoïèse, notamment par une action plutôt inhibitrice (Dallalio *et al.*, 1999).

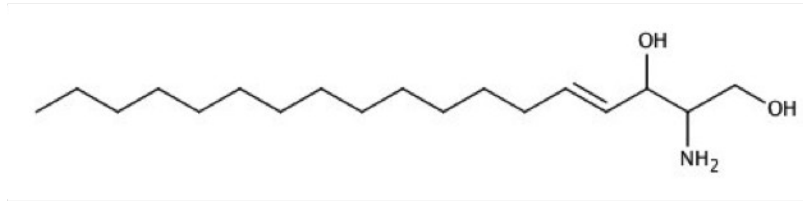
## **1.4 Les sphingolipides et la voie des céramides**

### **1.4.1 Structure des sphingolipides**

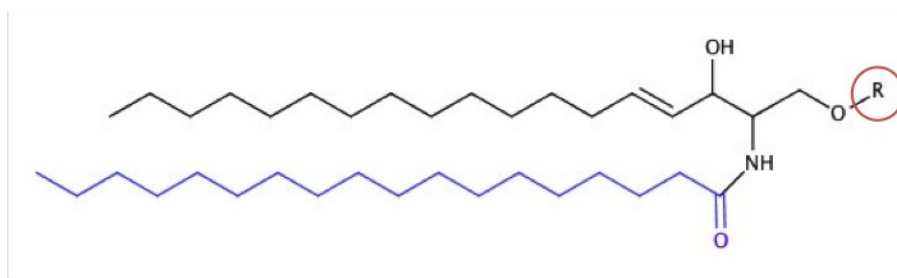
Les sphingolipides sont des lipides complexes dérivés de la sphingosine (Figure 21A) sur laquelle est fixé un acide gras *via* une liaison amide. Les sphingolipides les plus simples sont les céramides qui sont composés de sphingosine et d'un acide gras de longueur variable (Figure 21B). Les phosphosphingolipides et les glycosphingolipides sont plus complexes et sont constitués de sphingosine, d'un acide gras ainsi que d'une ramification composée d'un groupement contenant un phosphate ou un ose respectivement (Figure 21B). Par exemple, la sphingomyéline qui est un phosphosphingolipide est ramifiée avec de la phosphocholine *via* une liaison phosphodiester.



A



B



- R : —H (Céramide)



— ose (Glycosphingolipides)

### Figure 21 : Structures chimiques des sphingolipides

**A.** Sphingosine. La sphingosine est l'unité de base des sphingolipides complexes.

**B.** Sphingolipides. Les sphingolipides sont dérivés de la sphingosine par amidification d'un acide gras (bleu) au niveau du groupement amine et addition d'un groupement R qui peut être de nature variée. Le groupement R peut être un hydrogène et donner les sphingolipides les plus simples : les céramides. Il peut aussi être un groupement contenant un phosphate pour donner des sphingophospholipides. Par exemple, si ce groupement est une phosphocholine ceci formera la sphingomyéline. Enfin, le groupement R peut être un ose et donner les glycosphingolipides.

## **1.4.2 Métabolisme des sphingolipides**

Les céramides sont considérés comme l'élément central du métabolisme des sphingolipides. La formation des céramides peut être induite par différents stimuli comme le TNF $\alpha$  (Schutze *et al.*, 1992), le ligand de Fas (Cremesti *et al.*, 2001), le stress oxydant (Andrieu-Abadie *et al.*, 2001), des radiations ionisantes (Aureli *et al.*, 2014). Ils peuvent être obtenus par 3 voies principales : la synthèse *de novo*, l'hydrolyse de la sphingomyéline par les SMases et la voie dite de « sauvetage » impliquant de nombreuses enzymes (Figure 22).

### **1.4.2.1 La synthèse *de novo* des céramides**

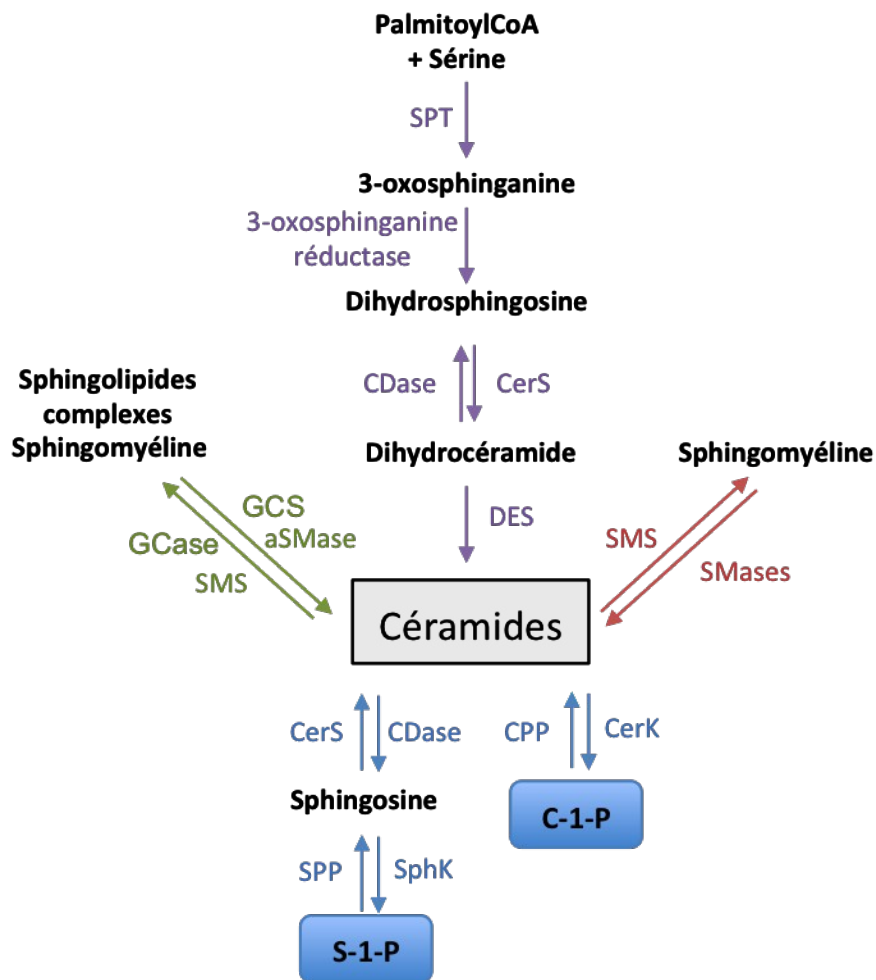
La synthèse *de novo* débute au niveau du RE par une réaction de condensation entre une sérine et le palmitoyl-coenzyme A (CoA) catalysée par la sérine palmitoyl transférase (SPT) pour former de la 3-oxosphinganine (Mandon *et al.*, 1992). La 3-oxosphinganine est ensuite réduite en dihydrosphingosine par la 3-oxosphinganine réductase. La dihydrosphingosine est ensuite prise en charge par une céramide synthase (CerS) pour être transformée en dihydrocéramide par ajout d'une chaîne alkyl. Il existe différents types de CerS capables de prendre en charge des substrats possédant des chaînes carbonées de longueurs différentes (Mizutani *et al.*, 2005). La réaction catalysée par les CerS est réversible grâce aux céramidases (CDases). Les dihydrocéramides sont alors convertis en céramides par la céramide désaturase (DES) qui catalyse l'ajout d'une liaison entre les positions 4 et 5 de la chaîne carbonée (Castro *et al.*, 2014).

### **1.4.2.2 Hydrolyse par les sphingomyélinases**

Les SMases appelées aussi sphingomyéline phosphodiésterases hydrolysent la partie phosphocholine de la sphingomyéline pour générer des céramides. Il existe les SMases de type acide, alcaline et neutre (aSMase, AlkSMase, nSMase), correspondant à leur localisation et au pH optimum pour leur activité enzymatique (Stancevic *et al.*, 2010). La réaction de formation des céramides est réversible puisque la sphingomyéline synthase (SMS) est capable de reformer de la sphingomyéline à partir de céramides.

### **1.4.2.3 La voie de « sauvetage »**

C'est un mécanisme de formation de céramides à partir du catabolisme de molécules complexes comme la sphingomyéline ou les glycosphingolipides. Ces molécules sont



**Figure 22 : Voies de biosynthèse des céramides**

Les céramides peuvent être produits par 3 voies impliquant de nombreuses enzymes. La voie *de novo* est représentée en violet, la voie d'hydrolyse par les sphingomyélinases en rouge et la voie de « sauvetage » en vert. Les lipides bioactifs issus des céramides sont indiqués en bleu.

SPT : Sérine palmitoyl transférase, CerS : Céramide synthase, CDase : Céramidase, DES : Céramide désaturase, SMS : Sphingomyéline synthase, SMase : Sphingomyélinase, GCS : Glucosylceramide synthase, GCase : Glucosylceramidase, C-1-P : Céramide-1-phosphate, S-1-P : Sphingosine-1-phosphate, SPP : Sphingosine phosphate phosphatase, SphK : Sphingosine kinase, CerK : Ceramide kinase, CPP : Ceramide phosphate phosphatase. Adapté de (Castro *et al.*, 2014)

dégradées au niveau des compartiments cellulaires acides par des enzymes telles que la aSMase ou la  $\beta$ -glucosidase acide pour former des céramides (Slotte, 2013).

Les céramides ainsi formés peuvent jouer leur rôle de métabolites secondaires, ou former d'autres sphingolipides bioactifs comme les céramides-1-phosphate (C1P) par action d'une céramide kinase (CerK) ou la sphingosine-1-phosphate (S1P) formée grâce à l'action de deux enzymes : la CDase et la sphingosine kinase (SphK) (Chalfant *et al.*, 2005).

### **1.4.3 Les sphingomyélinases**

#### **1.4.3.1 Généralités**

Les sphingomyélinases sont les enzymes qui catalysent la formation de céramides à partir de la sphingomyéline. Parmi les trois grands types de sphingomyélinases, la AlkSMase est exclusivement exprimée au niveau du tractus intestinal et de la bile et jouerait un rôle dans la digestion (Duan *et al.*, 1996). La aSMase et la nSMase sont quant à elles ubiquitaires et ont un rôle dans la réponse aux stress comme les radiations ionisantes, le LPS, le cisplatine ou des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IFN $\gamma$  ou le TNF $\alpha$  (Kim *et al.*, 1991, Adam *et al.*, 1996, Adam-Klages *et al.*, 1996, Jenkins *et al.*, 2009). Elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques ou pathologiques comme l'inflammation, la mort cellulaire, la différenciation, les cancers et les pathologies cardiaques et neurologiques comme la maladie d'Alzheimer (Shamseddine *et al.*, 2015).

#### **1.4.3.2 La sphingomyélinase acide**

La aSMase, la première sphingomyélinase découverte, est codée par le gène *SMPD1*. Sa transcription est activée par les facteurs de transcription AP-1 et Sp1 (Langmann *et al.*, 1999). De plus, son promoteur contient également un élément de réponse à l'acide rétinoïque (Murate *et al.*, 2002). Ce gène code trois transcrits dont le type 1 est la forme majeure et code l'enzyme active alors que les deux autres variants issus de l'épissage alternatif ne codent pas d'enzymes fonctionnelles (Schuchman *et al.*, 1992). Un déficit en aSMase conduit à la maladie de Niemann-Pick de type A et B (Schneider *et al.*, 1967). Cette enzyme est synthétisée sous forme de précurseur, elle est maturée dans le RE/Golgi puis se localise au niveau des endosomes/lysosomes (Jenkins *et al.*, 2011). Comme d'autres protéines lysosomales, elle possède un domaine saposine en N-terminal qui permet l'isolation du substrat et le domaine catalytique est situé du côté C-terminal (Gorelik *et al.*, 2016).

L'activité de la aSMase peut être régulée par le TNF $\alpha$  *via* le 1,2-diacylglycérol ou par le complexe TRADD/FADD/Caspase 8 associé au TNFR (Schutze *et al.*, 1994, Brenner *et al.*, 1998). A l'inverse, son activité peut être inhibée par la PI3K ou la S1P (Bilderback *et al.*, 2001, Gomez-Munoz *et al.*, 2003).

#### **1.4.3.3 La sphingomyélinase neutre 2**

Contrairement à la aSMase, il existe 4 types de nSMases : les nSMase 1, 2, 3 et la MA-SMase (Mitochondria-associated SMase) codées par des gènes différents (*SMPD2*, *SMPD3*, *SMPD4* et *SMPD5* respectivement). Malgré un site catalytique commun, il existe peu d'homologie entre les différentes SMases (Clarke *et al.*, 2006). De plus, leur localisation dans la cellule est différente (RE, Golgi, membrane plasmique ou mitochondrie) (Corcoran *et al.*, 2008, Milhas *et al.*, 2010, Wu *et al.*, 2010). La nSMase 2 est la sphingomyélinase la plus étudiée car elle joue un rôle important dans l'inflammation et la formation d'exosomes (Shamseddine *et al.*, 2015). Sa transcription est activée par les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 (Ito *et al.*, 2009). Elle possède deux régions hydrophobes en N-terminal qui ne traversent pas la membrane plasmique mais permettent la rétention de l'enzyme à proximité de la membrane et le site catalytique est situé en C-terminal (Tani *et al.*, 2007a). La nSMase 2 possède également deux sites de palmitoylation qui n'influencent pas l'activité de l'enzyme mais contribuent à l'association avec la membrane plasmique (Tani *et al.*, 2007b). La région située entre les domaines N et C-terminal pourrait être une région régulatrice car elle contient un site de fixation de la calcineurine, une sérine/thréonine phosphatase ainsi que différents sites de phosphorylation (Filosto *et al.*, 2010, Filosto *et al.*, 2012). Les phosphorylations situées en S173, S209, S291, S294 et S301 régulent la stabilité de l'enzyme (Filosto *et al.*, 2012). La nSMase 2 peut être activée par le TNF $\alpha$  *via* p38 ou PKC $\delta$  mais la façon dont ces kinases activent la nSMase (phosphorylation directe ou par l'intermédiaire d'autres voies de signalisation) n'est pas connue (Clarke *et al.*, 2007). Enfin, le TNF $\alpha$  peut également activer la nSMase 2 par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice FAN qui se lie au niveau du site NSD (nSMase activation domain) du récepteur au TNF $\alpha$  (Adam-Klages *et al.*, 1996).

#### **1.4.4 Le rhéostat des sphingolipides**

Les céramides peuvent être transformés en sphingosine puis en S1P par l'action successive de la CDase et de la SphK. Ces réactions sont réversibles et catalysées par la SPP et la CerS (Figure 22). Différentes études ont montré que les céramides et la S1P régulent la croissance cellulaire et la survie de manière opposée (Cuvillier *et al.*, 1996). C'est l'interconversion de

ces métabolites avec des effets opposés sur le destin cellulaire qui définit le rhéostat des sphingolipides (Newton *et al.*, 2015).

#### **1.4.4.1 Les céramides**

Les céramides sont des régulateurs importants qui jouent un rôle dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, l'apoptose, l'autophagie ou la différenciation (El Alwani *et al.*, 2006). En effet, la quantité de céramides est augmentée en réponse à des agents inducteurs de l'apoptose comme le TNF $\alpha$ , de ligand de Fas ou des agents de chimiothérapie (Pettus *et al.*, 2002). D'une part, la génération de céramides peut altérer les propriétés de la membrane plasmique en formant des plateformes riches en céramides (Grassme *et al.*, 2007). Ces domaines permettent la séquestration de protéines impliquées dans la signalisation et sont, par exemple, essentiels pour la signalisation engagée par l'activation des récepteurs au TNF $\alpha$  (Legler *et al.*, 2003). En plus de leur rôle dans la structure membranaire, ils jouent également un rôle de second messager et activent différentes kinases (CAPK pour ceramide-activated protein kinase), phosphatases (CAPP pour ceramide-activated protein phosphatase) et protéases. Parmi les CAPK, on retrouve la KSR (kinase suppressor of Ras) qui est activée par les céramides en réponse au TNF $\alpha$  et active Raf-1 (Zhang *et al.*, 1997, Muller *et al.*, 1998, Xing *et al.*, 2001). Les céramides peuvent également se lier à Raf et l'activer directement (Huwiler *et al.*, 1996). De la même manière la PKC $\zeta$  interagit directement avec les céramides et module la réponse au TNF $\alpha$  (Lozano *et al.*, 1994). Parmi les CAPP, on retrouve les phosphatases PP1 (protéine phosphatase 1) et PP2A (protéine phosphatase 2A) (Dobrowsky *et al.*, 1993) qui ont pour cible différentes protéines comme Bcl-2, AKT ou c-jun (Reyes *et al.*, 1996, Deng *et al.*, 1998, Sato *et al.*, 2000). Enfin, les céramides interagissent avec la cathépsine D pour induire son activité protéolytique et participer à l'apoptose induite par le TNF $\alpha$  (Deiss *et al.*, 1996, Heinrich *et al.*, 2000).

#### **1.4.4.2 Les céramidases**

Les CDases, qui catalysent la formation de Sph à partir des céramides, sont classées, comme les SMases, en fonction de leur pH optimum (Mao *et al.*, 2008). La CDase acide (aCDase) est une enzyme lysosomale codée par le gène *ASAH1* dont la transcription peut être régulée par c-jun (Ferlinz *et al.*, 2001, Tirodkar *et al.*, 2015). Un déficit en aCDase est responsable de la maladie de Farber (Ehlert *et al.*, 2007). Cette maladie lysosomale affecte de nombreux organes et peut conduire à des troubles hématologiques dont l'anémie (Dworski *et al.*, 2015). La CDase neutre (nCDase) codée par le gène *ASAH2*, est localisée au niveau de la membrane

plasmique (Tani *et al.*, 2003). Sa transcription est régulée par des facteurs de transcription tels que GATA-1 et Oct1 (O'Neill *et al.*, 2011). Elle intervient principalement dans la régulation de la production et du relargage de la Sph et de la S1P (Tani *et al.*, 2005). La nCDase joue un rôle protecteur contre les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  ou le TNF $\alpha$ . En effet, elle empêche par exemple l'induction de l'apoptose par le TNF $\alpha$  (Osawa *et al.*, 2005, Mao *et al.*, 2008). Enfin, il existe trois types de céramidases alcalines (AlkCDases), codées par trois gènes différents (ACER1 à 3), qui diffèrent par leur localisation tissulaire et intracellulaire (Gault *et al.*, 2010).

#### **1.4.4.3 La sphingosine kinase**

Il existe deux types de SphK, les SphK 1 et 2 qui catalysent la formation de S1P à partir de sphingosine de manière dépendante de l'ATP. Ces enzymes sont codées par deux gènes différents *SPHK1* et *SPHK2* avec trois variants d'épissage pour le type 1 et deux variants pour le type 2 qui diffèrent par la longueur de la région N-terminale (Adams *et al.*, 2016). La SphK1 et la SphK2 présentent des rôles opposés. En effet, la SphK1 induit plutôt la croissance et la survie alors que la SphK2 induit l'apoptose (Pyne *et al.*, 2009). L'expression de la SphK1 est également augmentée au cours de l'érythropoïèse (Kingsley *et al.*, 2013, Shi *et al.*, 2014) et les souris déficientes en SphK1 et SphK2 présentent une anémie (Xiong *et al.*, 2014). La transcription de la sphingosine kinase 1 est régulée par des facteurs de transcription tels que AP-1, Sp-1 ou GATA-1 (Muntean *et al.*, 2005, Sobue *et al.*, 2005, Paugh *et al.*, 2009). La SphK1 peut être activée par de nombreux stimuli comme par exemple les œstrogènes, le LPS, le TGF $\beta$  ou le TNF $\alpha$  via notamment sa phosphorylation par ERK-2 (Pitson *et al.*, 2003, Sukocheva *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2004, Yamanaka *et al.*, 2004, Pchejetski *et al.*, 2011). Le TNF $\alpha$  peut également conduire à la diminution de l'expression de la SphK1 *via* sa dégradation par la cathepsine B (Taha *et al.*, 2005).

#### **1.4.4.4 La sphingosine-1-phosphate**

La S1P joue un rôle antagoniste des céramides dans de nombreux phénomènes comme la croissance et la survie cellulaire (Spiegel *et al.*, 2003). En effet, contrairement aux céramides, la S1P a un effet mitogénique et anti-apoptotique dans différents modèles (Cuvillier *et al.*, 1998, Auge *et al.*, 1999, Van Brocklyn *et al.*, 2002). La S1P peut être excrétée par de nombreux types cellulaires comme les cellules endothéliales, les plaquettes ou les érythrocytes dans le milieu extracellulaire et est notamment retrouvée dans le sang où elle agirait comme facteur chimiotactique (Hanel *et al.*, 2007, Ulrych *et al.*, 2011, Liu *et al.*,

2016). La S1P peut agir en tant que messenger intracellulaire ou agir de manière autocrine ou paracrine *via* l'activation de récepteurs membranaires spécifiques (Alvarez *et al.*, 2007). En effet, la S1P peut exercer des effets intracellulaires notamment sur la survie et la prolifération cellulaire indépendamment des récepteurs spécifiques (Olivera *et al.*, 2003). Il existe 5 récepteurs à la S1P (S1PR) qui sont des récepteurs couplés aux protéines G (Rosen *et al.*, 2013). Les récepteurs sont couplés à différents sous-types de protéines G conférant des rôles différents à chaque récepteurs (Patmanathan *et al.*, 2017). Ainsi, les différents S1PR régulent différentes voies de signalisation comme les GTPases Rho, l'adénylate cyclase, JNK, la phospholipase C, Akt ou ERK (Bjorklund *et al.*, 2005, Jiang *et al.*, 2007, Takashima *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 2011b, Taniguchi *et al.*, 2012).



## 2 Objectifs

La présence continue et prolongée de TNF $\alpha$  chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques et de cancer provoque l'apparition d'anémie (Koury, 2014). Le TNF $\alpha$  est en effet capable d'inhiber le développement érythroïde en induisant une réduction de la production d'Epo par le rein (Roodman *et al.*, 1989). Il a également été montré que le TNF $\alpha$  peut agir directement sur les cellules érythroblastiques et les CSH, même en présence d'Epo. Le TNF $\alpha$  diminue l'expression des gènes érythroïdes comme l'EpoR, la GPA et la HMBS *via* la modulation de l'expression de FT tels que GATA-1, GATA-2 et PU.1 (Xiao *et al.*, 2002, Morceau *et al.*, 2006, Buck *et al.*, 2008, Grigorakaki *et al.*, 2011). La fixation du TNF $\alpha$  à son récepteur conduit à l'activation de nombreuses voies de signalisation comme celles de NF- $\kappa$ B, p38, ou JNK mais aussi des sphingolipides bioactifs avec la production de céramides (MacEwan, 2002). Cette dernière est impliquée dans de nombreux processus biologiques tels que la différenciation, la prolifération et l'autophagie.

**Hypothèse :** L'activation soutenue et prolongée des voies de signalisation induites par le TNF $\alpha$  comme les céramides interfère-t-elle avec le processus de développement érythroïde ? De plus, le TNF $\alpha$  et les céramides modulent-ils le réseau de régulation constitué des FT et des miR impliqués dans l'hématopoïèse afin de perturber l'érythropoïèse en agissant négativement sur la régulation de l'autophagie, nécessaire à la maturation des érythrocytes ?

**Objectif de la thèse :** Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui conduisent à l'inhibition de l'érythropoïèse par le TNF $\alpha$ , notre objectif principal sera d'étudier l'implication de la voie des SMases/céramides sur le réseau de régulation miR/FT ainsi que sur l'autophagie. L'érythropoïèse sera reproduite *in vitro* en stimulant les cellules CSPH CD34<sup>+</sup> ainsi que les cellules érythroleucémiques TF-1 ou K562 avec l'Epo ou l'Acla.

### Objectifs spécifiques :

Nous proposons d'étudier rôle de la voie TNF $\alpha$ /SMase/céramides dans :

#### 1) L'inhibition de l'érythropoïèse.

En utilisant comme modèles de différenciation *in vitro* les CSPH CD34<sup>+</sup> et les cellules TF-1 induites par l'Epo ainsi que les cellules K562 traitées à l'Acla, nous analyserons

l'implication de cette voie sur l'expression de différents marqueurs érythroïdes (Hb, GPA, EpoR, globines). L'expression de la GPA sera analysée par cytométrie de flux, le nombre de cellules produisant de l'hémoglobine par un test de coloration à la benzidine et l'expression des globines et de l'EpoR par Western Blot et PCR en temps réel. L'implication des SMases dans l'inhibition de l'érythropoïèse sera montré en co-traitant les cellules avec du TNF $\alpha$  et un inhibiteur de sphingomyélinase : le GW4869 qui est un inhibiteur de la nSMase et la désipramine qui est un inhibiteur de la aSMase. L'effet des céramides sur ces marqueurs sera également analysé en utilisant une sphingomyélinase bactérienne qui possède une activité nSMase et conduit à la formation de céramides endogènes ainsi qu'un analogue de céramide possédant une chaîne carbonée plus courte : le céramide C2. L'implication d'autres sphingolipides bioactifs dans l'inhibition de l'érythropoïèse sera exclue en étudiant l'effet de la sphingosine-1-phosphate et des dihydrocéramides sur l'expression des marqueurs érythroïdes.

## **2) Les autres voies de l'hématopoïèse.**

En utilisant comme modèle les CSPH CD34<sup>+</sup> induites par l'Epo, nous analyserons l'effet du TNF $\alpha$ , des céramides C2, de la SMase bactérienne et des inhibiteurs de SMase sur l'induction potentielle d'une autre voie de différenciation. La morphologie cellulaire sera analysée après coloration de MGG et la formation de colonies par tests clonogéniques. Au niveau moléculaire, l'expression de marqueurs membranaires spécifiques sera analysée par cytométrie de flux et l'expression de FT (GATA-1, GATA-2 et PU.1) et de miR (miR-221, -223, -126, -155, -146a, -144, -451, -16, -15a, 23a et -486) impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse sera analysée par Western blot et PCR en temps réel respectivement.

## **3) L'autophagie.**

En utilisant comme modèle les CSPH CD34<sup>+</sup> induites par l'Epo, nous étudierons l'effet du TNF $\alpha$ , des céramides C2, de la SMase bactérienne et des inhibiteurs de SMase sur l'autophagie qui est un phénomène essentiel à la différenciation érythroïde. La morphologie cellulaire sera analysée par microscopie électronique à transmission. La conversion de LC3 sera observée par Western Blot et par transfection du plasmide GFP-LC3. L'expression de SQSTM1/p62 ainsi d'autres protéines impliquées dans l'autophagie telles que Atg7, Atg5, beclin 1 et Rubicon sera analysée par Western Blot. De plus, la voie de régulation PI3K/AKT/mTOR/ULK1/Atg13 sera analysée par Western Blot. Enfin, l'implication de l'autophagie dans l'inhibition de l'érythropoïèse par le TNF $\alpha$  sera évaluée en utilisant un inducteur de l'autophagie : la rapamycine.

### **3 Matériels et méthodes**

#### **3.1 Culture cellulaire et traitements**

##### **3.1.1 Cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup>**

###### **3.1.1.1 Isolement des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup>**

Les échantillons de sang de cordon ombilical sont fournis par la maternité de la Clinique E. Bohler (Luxembourg) avec l'accord du comité d'éthique de la clinique et du comité d'éthique de recherche après consentement des futurs parents sur la procédure. Le sang de cordon est récupéré dans des tubes de 50 mL contenant 20 U/mL (unités/mL) d'héparine (Ratiopharm, Allemagne) diluée dans du DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Lonza, Belgique). Le sang est alors dilué au 1/3 dans du DPBS contenant 2 mM d'EDTA (éthyl diamine tétraacétate, MP Biomedicals, Belgique) puis déposé dans des tubes avec filtres contenant 15 mL de Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare, Pays-Bas). L'ensemble est centrifugé 16 minutes à 800 g, afin de permettre la séparation des cellules en fonction de leur densité grâce au Ficoll. Les globules rouges et les granulocytes, qui sont plus denses que le Ficoll, vont sédimenter au fond du tube. Les cellules mononuclées, parmi lesquelles se trouvent les cellules CD34<sup>+</sup>, sont présentes à l'interface entre le Ficoll et le plasma. Après centrifugation, les cellules mononuclées sont récupérées, lavées avec du DPBS-EDTA puis comptées. Des billes magnétiques couplées à des anticorps anti-CD34 (CD34 microbead kit, Miltenyi Biotec, Allemagne) sont mises en contact avec les cellules pendant 30 minutes à 4°C. Puis les cellules sont lavées avec 10 mL de tampon MACS (Magnetic Cell Sorting : EDTA 2 mM, sérum albumine bovine (SAB) 5%) et déposées sur la colonne de purification magnétique (LS MACS separation column, Miltenyi Biotec) préalablement équilibrée avec 2 mL de tampon MACS. Après trois lavages avec 3 mL de tampon MACS, les cellules sont éluées par 4 mL de tampon MACS mécaniquement grâce à un piston. Les 4 mL obtenus sont déposés sur une seconde colonne préalablement équilibrée. Après trois lavages successifs, une élution finale dans 4 mL de tampon MACS permet de récupérer les cellules CD34<sup>+</sup>.

La caractérisation des cellules après isolation a été effectuée au laboratoire par le Dr. Christina Grigorakaki (Grigorakaki *et al.*, 2011). Après enrichissement (J-3), la population cellulaire évaluée par cytométrie de flux est constituée à 95,4% ± 0,65 de cellules CD34<sup>+</sup> alors que les populations minoritaires sont représentées par des cellules exprimant les marqueurs CD36, CD235a (GPA) (érythrocytaires), CD41 (mégacaryocytaires), CD11b (myélo-monocytaires) et CD24 (granulocytes et lymphocytes B).

### 3.1.1.2 Conditions de culture des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup>

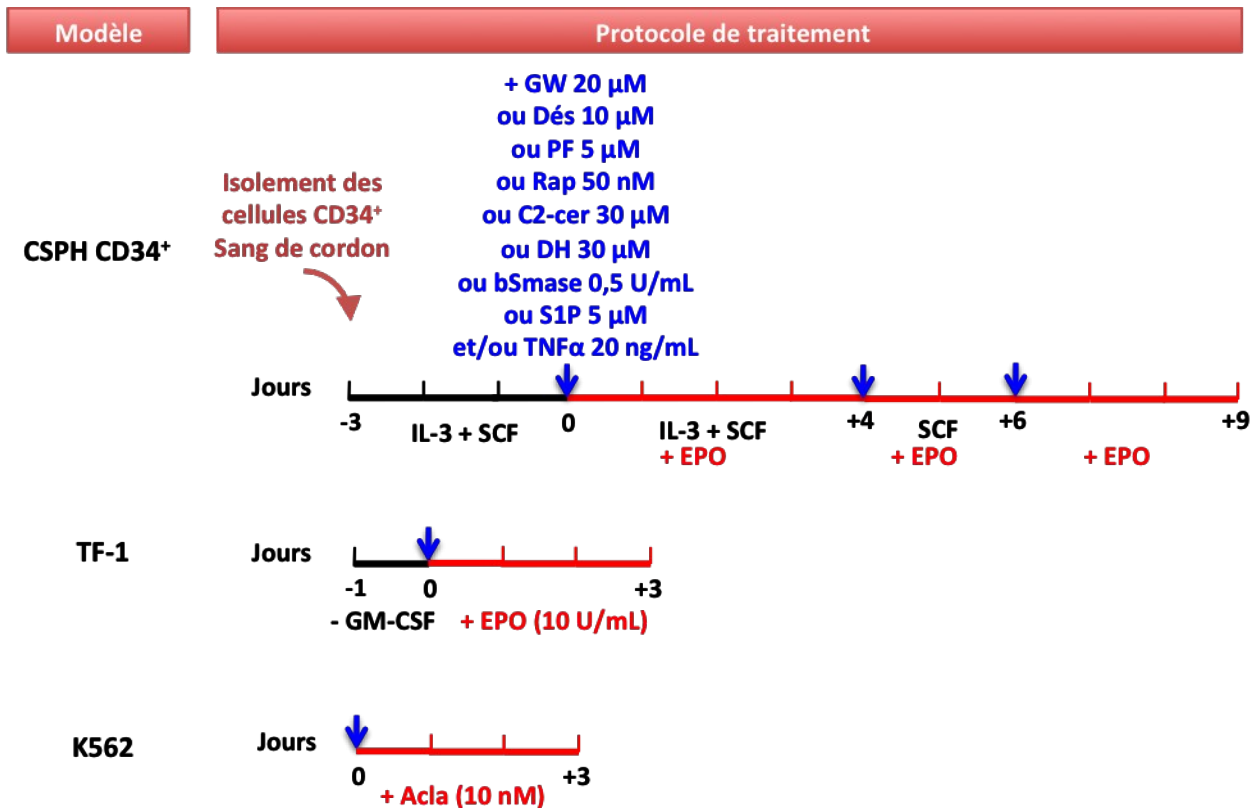
Les CSPH CD34<sup>+</sup> isolés sont comptés et mises en culture dans un incubateur à 37°C, 95% d'humidité et 5% de CO<sub>2</sub> à une concentration de 2x10<sup>5</sup> cellules/mL dans un milieu sans sérum (Stem Line Medium II, Sigma, Belgique) additionné d'un mélange d'antibiotiques, de L-glutamine (Lonza), de SCF (50 ng/mL) et d'IL-3 (10 ng/mL) (ReliaTech, Allemagne) qui permettent la croissance et la survie *in vitro* des CSH. La composition du milieu différenciant est basée sur le protocole établi par Carlile *et al.* (Carlile *et al.*, 2004). Après 3 jours de culture, l'érythropoïèse est induite par l'ajout de 2 U/mL d'érythropoïétine recombinante humaine (Epo) (Epoïétine β, NeoRecormon, Roche, France). L'ajout de l'Epo correspond au jour 0 (J0). Au jour 4, les cellules sont centrifugées 7 minutes à 340 g, puis cultivées dans un milieu contenant 10 ng/mL de SCF et 2 U/mL d'Epo. Enfin, au jour 6, les cellules sont centrifugées et reprises dans du milieu contenant 2 U/mL d'Epo (Tableau 1). Les inhibiteurs de SMase, de mTOR et de la SphK1 sont ajoutés une heure avant le traitement au TNFα et le TNFα, la bSMase, les C2-cer, les DH et la S1P sont ajoutés une heure avant le traitement à l'Epo. Les cellules sont traitées à nouveau aux jours 4 et 6 après le changement de milieu (Figure 23).

### 3.1.1.3 Efficacité du milieu différenciant

L'efficacité du milieu différenciant a été évaluée en réalisant une coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG) et un test de coloration à la benzidine (cf Matériels et méthodes 3.3 et 3.4 respectivement) aux jours 0, 4, 6, et 9 de culture. La présence des différents stades de l'érythropoïèse et de réticulocytes à 9 jours de culture ainsi qu'un pourcentage de cellules produisant de l'Hb atteignant 80% témoigne de la capacité à reproduire l'érythropoïèse *in vitro* à partir des CSPH CD34<sup>+</sup> isolés (Figure 24).

### 3.1.2 Les lignées érythroleucémiques humaines

Les lignées cellulaires utilisées sont cultivées dans du milieu de culture RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Lonza, Belgique) contenant 10% de SVF (sérum de veau foetal) et 5% d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/ml, Cambrex) et d'antifongiques (25 µg/ml amphotéricine B). Les cultures sont placées dans un incubateur à 37°C, 95% d'humidité et 5% de CO<sub>2</sub>. Le comptage des cellules s'effectue sur cellules de Malassez au microscope optique. La viabilité des cellules est évaluée par le test d'exclusion au bleu de Trypan. La viabilité cellulaire correspond au nombre de cellules viables / nombre de cellules totales x100.



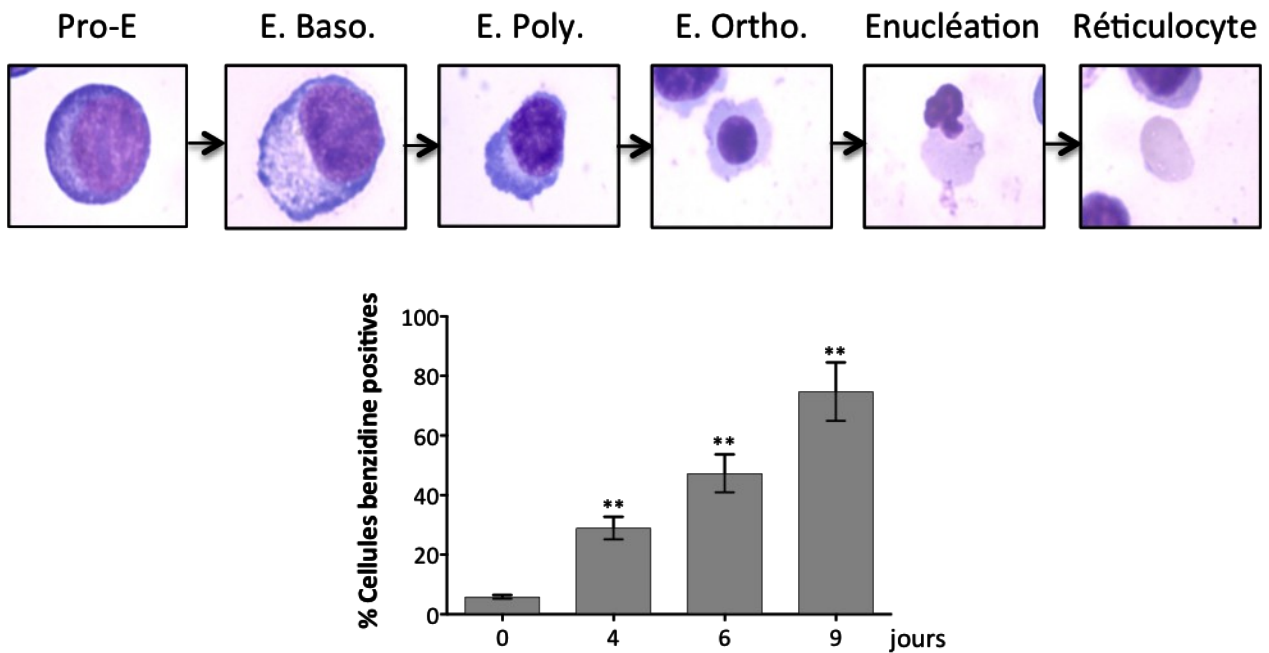
**Figure 23 : Conditions de culture et de traitement**

L'isolement des cellules CD34<sup>+</sup> correspondant au jour -3 est réalisé grâce à des billes magnétiques couplées à un anticorps anti-CD34. Après isolement, les cellules CD34<sup>+</sup> sont cultivées pendant 3 jours en présence de 10 ng/mL d'interleukine 3 (IL-3) et de 50 ng/mL de SCF (Stem cell factor) afin qu'elles prolifèrent. Ces cellules sont capables de se différencier en cellules érythroïdes en réponse à l'Epo à 2 U/mL. Au jour +4, les cellules sont cultivées en présence de SCF et d'Epo et au jour +6 avec de l'Epo seule.

Les cellules TF-1 sont privées de GM-CSF la veille du traitement (-GM-CSF) puis cultivées pendant 3 jours en présence de 10 U/mL d'Epo afin de produire de l'Hb et d'exprimer des marqueurs érythroïdes. Les cellules K562 sont capables de se différencier après 3 jours de traitement par 10 nM d'Aclacinomycine (Acla). Le GW4869 (GW), la désipramine (Des), le PF-543 (PF), la rapamycine (Rap), les céramides C2 (C2-cer), les dihydrocéramides C2 (DH), la sphingomyélinase bactérienne (bSMase), la sphingosine-1-phosphate (S1P) et/ou le TNFα seront ajoutés à la culture au jour zéro, une heure avant l'addition de l'Epo.

**Tableau 1 : Composition des milieux de culture des cellules CD34<sup>+</sup>**

	J-3/J0	J0/J4	J4/J6	J6/J9
Epo	/	2 U/mL		
Antibiotiques	0,1 U/mL			
L-Glutamine	4 mM			
SCF	50 ng/mL	10 ng/mL	10 ng/mL	/
IL-3	10 ng/mL	10 ng/mL	/	/



**Figure 24 : Efficacité du milieu différenciant**

L'efficacité du milieu différenciant a été évaluée par une coloration de MGG après 9 jours de culture des CSPH CD34<sup>+</sup>. Les différents stades de l'érythropoïèse sont reproduits *in vitro*. Le pourcentage de cellules produisant de l'Hb a été évalué aux jours indiqués par un test de coloration à la benzidine.

Pro-E : Pro-érythroblaste, E. Baso. : érythroblaste basophile, E. Poly : érythroblaste polychromatophile, E. Ortho : érythroblaste orthochromatophile.

### 3.1.2.1 Les cellules TF-1

La lignée TF-1 a été établie en 1989 à partir de cellules prélevées chez un patient atteint d'érythroleucémie (leucémie myéloïde aiguë). Elles montrent une dépendance pour de nombreuses cytokines pour leur prolifération et leur survie en culture dont le GM-CSF que nous utiliserons pour la maintenance de ces cellules à 5 ng/mL (ReliaTech, Allemagne). Le milieu de culture est renouvelé tous les trois jours et le nombre de cellules est maintenu à  $3 \times 10^5$ /mL. La différenciation érythroïde des cellules TF-1 est induite avec 10 U/mL d'Epo (Lui *et al.*, 2006, Buck *et al.*, 2008) après 12h de privation en GM-CSF. Après décongélation et mise en culture, les cellules TF-1 répondent à l'Epo au bout de dix passages.

### 3.1.2.2 Les cellules K562

La lignée K562 a été établie à partir des cellules prélevées dans le liquide pleural d'une patiente atteinte d'une leucémie myéloïde chronique en phase blastique. Les cellules K562 expriment des marqueurs spécifiques de différenciation érythroïde comme les globines et l'EpoR, et sont capables de produire de l'Hb sous l'effet de l'aclacinomycine A (Acla) (10 nM) et de l'hémine (Trentesaux *et al.*, 1993, Buck *et al.*, 2009). En revanche, elles ne répondent pas à l'Epo. Le milieu de culture est renouvelé tous les 3 jours et le nombre de cellules est maintenu à  $2 \times 10^5$  cellules/mL.

## 3.2 Test clonogénique

Ce test est basé sur la capacité des cellules à proliférer en milieu semi-solide en formant des colonies dont la morphologie est caractéristique du type cellulaire et de son stade de différenciation. Les cellules CD34<sup>+</sup> (500 cellules) au jour 0 sont reprises dans 1 mL de methocult H4230 (StemCell technologies) contenant 0,1 U/mL d'antibiotiques, 4 mM de L-glutamine, 10 ng/mL d'IL-3 et de SCF et 2 U/mL d'Epo puis traitées avec le GW4869 (20  $\mu$ M), la désipramine (10  $\mu$ M), les C2-cer (30  $\mu$ M), la sphingomyélinase bactérienne (0,5 U/mL), la sphingosine-1-phosphate (5  $\mu$ M) et/ou le TNF $\alpha$  (20 ng/mL). Les cellules sont ensuite placées dans un incubateur à 37°C, 95% d'humidité et 5% de CO<sub>2</sub>. Au jour 14, les colonies sont observées au microscope optique (microscope Leica DMIRB), identifiées selon leur morphologie comme appartenant aux lignées érythroïde, granulocytaire ou monocyttaire et comptabilisées.



### **3.3 Coloration de May-Grünwald Giemsa modifiée**

La coloration MGG permet de visualiser par microscopie les composants cellulaires et ainsi identifier les différentes cellules du sang. Cette technique, souvent utilisée dans le diagnostic de maladies du sang, va reposer sur l'utilisation de deux colorants neutres :

- Le May-Grünwald (Merck) : contenant un colorant acide (l'éosine) et un colorant basique (le bleu de méthylène)
- Le Giemsa (Merck) : contenant de l'éosine et un colorant basique (l'azur de méthylène)

Les colorants basiques vont fixer les composants cellulaires acides comme les acides nucléiques qui vont apparaître en bleu/violet. Les colorants acides vont fixer les constituants cellulaires basiques comme l'Hb et vont ainsi leur conférer une couleur plutôt rose/orangée.

Environ  $4 \times 10^5$  cellules sont centrifugées 7 minutes à 350 g, puis le culot obtenu est repris dans 1 mL de PBS 1X. Après une seconde centrifugation de 7 minutes à 350 g, le culot cellulaire est repris dans 200  $\mu$ L de PBS et 100  $\mu$ L de la solution obtenue vont être projetés sur une lame de microscope grâce au Cytofuge®2 de STAT Spin. La coloration MGG modifiée est réalisée grâce au kit Diff-Quik (Microptic, Espagne). La lame obtenue est plongée successivement dans des bains de fixateur (Diff Quik Fix), de Diff-Quik I qui contient de l'éosine et de Diff-Quik II qui contient des thiazines puis la lame est rincée à l'eau neutre. Une fois séchée, la lame est observée par microscopie à contraste de phase (microscope Leica DM2000).

### **3.4 Test de coloration à la benzidine**

Cette technique repose sur l'activité pseudo-péroxydasique de l'Hb. En effet, l'Hb est capable d'hydrolyser le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) pour donner du dioxygène ( $O_2$ ) qui va oxyder la benzidine. Une fois oxydée, la benzidine se colore en bleu/violet permettant d'identifier et de comptabiliser les cellules qui produisent de l'Hb. Environ  $4 \times 10^5$  cellules sont reprises dans 100  $\mu$ L de NaCl 0,9% puis additionnées de 50  $\mu$ L d'un mélange benzidine 0,2% /  $H_2O_2$  30% (Sigma). La préparation est placée pendant 20 minutes à l'obscurité à température ambiante. L'ensemble est dilué dans 300  $\mu$ L de NaCl 0,9% puis déposé sur lame de Malassez. Les cellules sont comptées grâce au microscope à contraste de phase (Leica DM2000). Le taux de cellules présentant une hémoglobinisation représente le nombre de cellules benzidines positives par rapport au nombre de cellules totales.

### 3.5 Marquage cellulaire : cytométrie et microscopie à fluorescence

Le marquage cellulaire est basé sur la reconnaissance antigène/anticorps. Il est possible de marquer des antigènes présents en surface des cellules ou des antigènes intracellulaires.

#### 3.5.1 Marquage des céramides

Environ  $5 \times 10^6$  cellules sont centrifugées 7 minutes à 340 g. Le culot est lavé dans 1 mL de PBS 1X. Les cellules sont ensuite fixées dans du paraformaldéhyde 4% pendant 20 minutes à température ambiante. Après fixation, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1X puis perméabilisée avec du Triton-X 0,2% pendant 10 minutes à température ambiante. Après 2 lavages avec du PBS 1X, les cellules sont incubées pendant 2h à température ambiante avec l'anticorps primaire puis lavées et incubées 1h avec l'anticorps secondaire (Tableau 2). Les cellules sont ensuite incubées pendant 15 minutes à 37°C en présence du réactif de Hoechst (4  $\mu$ L/mL) afin de pouvoir visualiser les noyaux. Les cellules sont analysées par microscopie à fluorescence (Microscope inversé Cell M, Olympus).

**Tableau 2 : Conditions d'utilisation des anticorps pour le marquage des céramides**

	Anticorps primaire	Anticorps secondaire
<b>céramides</b>	<i>Ceramide (MID 15B4) Monoclonal Enzo Life Sciences ALX-804-196-T050 Dilution: 1/50 Incubation: 2h, 20°C</i>	<i>Souris A11031 Dilution: 1/50 Incubation: 1h, 20°C</i>

### **3.5.2 Marquage à l'annexine V-FITC et à l'iodure de propidium**

Au cours de l'apoptose et de l'éryptose, la phosphatidylsérine, qui se trouve normalement du côté interne de la membrane plasmique, est rapidement exposée du côté extracellulaire. L'annexine V est une protéine qui possède une forte affinité pour la phosphatidylsérine. Couplée à un fluorochrome (FITC), elle va permettre de détecter l'exposition de la phosphatidylsérine du côté extracellulaire et d'identifier les cellules en apoptose précoce, tardive et en nécrose. L'iodure de propidium est un agent intercalant qui n'est capable d'entrer que dans les cellules dont la membrane est perméable donc dans les cellules en nécrose. Les cellules viables seront donc annexine V(-)/iodure de propidium(-), les cellules annexine V(+)/iodure de propidium(-) correspondront aux cellules en apoptose précoce et les cellules annexine V(+)/iodure de propidium(+) à l'apoptose tardive et nécrose. Après traitement,  $5 \times 10^5$  cellules sont centrifugées 7 minutes à 340 g, puis lavées avec du PBS 1X. Le culot est repris dans 500  $\mu$ L de tampon binding 1X (annexin V-FITC apoptosis detection kit 5, BD Pharmingen) et 100  $\mu$ L de la solution sont incubés avec 5  $\mu$ L d'annexine V-FITC et/ou 5  $\mu$ L d'iodure de propidium. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante à l'obscurité, 400  $\mu$ L de tampon binding 1X sont ajoutés et les cellules sont analysées par cytométrie avec un cytomètre FACSCalibur (Becton-Dickinson, Belgique). L'étude statistique se fait à l'aide du programme FlowJO (version 8.8.7, Tree Star, Etats-Unis) et est basée sur l'analyse de 10 000 événements par échantillon.

### **3.5.3 Cytométrie de flux**

Environ  $5 \times 10^5$  cellules sont centrifugées 5 minutes à 350 g. Le culot est lavé dans 1 mL de PBS 1X, puis centrifugé à nouveau. Le culot est repris dans 300  $\mu$ L de PBS 1X et l'anticorps est ajouté à la concentration et au temps mis au point préalablement (Tableau 3). Pour l'analyse par cytométrie, les mêmes cellules sont parallèlement mises en contact avec un contrôle isotypique. Le contrôle isotypique est un anticorps de même isotype que celui utilisé pour le marquage mais non-spécifique de l'antigène à marquer. Il sert ainsi de contrôle négatif, permettant de distinguer un signal de bruit de fond non-spécifique du signal spécifique de l'anticorps. L'immunofluorescence est mesurée par cytométrie avec un cytomètre FACSCalibur (Becton-Dickinson, Belgique). L'étude statistique se fait à l'aide du programme FlowJO (version 8.8.7, Tree Star, Etats-Unis) et est basée sur l'analyse de 10 000 événements par échantillon.

**Tableau 3 : Conditions d'utilisation des anticorps en cytométrie de flux**

Anticorps	Fluorochrome	Réf.	Contrôle isotypique	Réf.	Dilution
CD34	<i>FITC</i>	<i>BD3458 01</i>	<i>IgG1,<math>\kappa</math></i>	<i>BD555748</i>	<i>1/20 2h à 4°C</i>
CD235a/ GPA	<i>PE-Cy<sup>TM</sup>5</i>	<i>BD5599 44</i>	<i>IgG2b,<math>\kappa</math></i>	<i>BD555744</i>	<i>1/100 30min. à 4°C</i>
CD11b	<i>PE</i>	<i>BD3331 42</i>	<i>IgG2a,<math>\kappa</math></i>	<i>BD555574</i>	<i>1/20 2h à 4°C</i>

### **3.6 Transfection des cellules CD34<sup>+</sup>**

Les cellules CD34<sup>+</sup> sont transfectées au jour 0 par nucléofection en utilisant le kit Amaxa (Human CD34 cell Nucleofector® Kit, Lonza). 5x10<sup>5</sup> cellules sont reprises dans 100 µL de solution de Nucleofector® et 5 µg de plasmide pSelect-GFP-LC3 (InvivoGen) ou de plasmide pmaxGFP® (Lonza) sont ajoutés à la solution. La transfection s'effectue avec le programme U-008 de l'appareil Nucleofector™ (Lonza). Les cellules sont ensuite reprises dans du milieu de culture J0-J4 à une concentration de 2x10<sup>5</sup> cellules/mL puis placées à l'incubateur. Les cellules sont traitées 4h après la transfection. L'efficacité de transfection est évaluée après 24h et correspond au nombre de cellules positives à la GFP par rapport au nombre de cellules total. L'efficacité de transfection est de 34,8% ± 6,3 en moyenne.

### **3.7 Microscopie électronique à transmission (MET)**

Environ 10<sup>6</sup> cellules ont été fixées dans un mélange de glutaraldéhyde 2,5% dans un tampon cacodylate 0,1 M pH 7,2 pendant 1 heure à 4°C. Les cellules sont ensuite rincées 2 fois avec du tampon cacodylate (Electron Microscopy Sciences) puis stockées à 4°C dans le tampon. Il s'en suit une post-fixation au tétraoxyde d'osmium 1% dans le tampon cacodylate pendant 1 heure à température ambiante. Puis les échantillons sont déshydratés progressivement dans des bains d'éthanol successifs (50%, 70%, 80%, 95%, 100%) et rincés 3 fois 20 minutes dans de l'oxyde de propylène. Après avoir été pré-imprégnés pendant 1 heure dans un mélange en proportions égales de résine EMBED 812 et oxyde de propylène, les échantillons sont imprégnés 12 heures dans la résine pure. Après inclusion dans un moule en latex puis polymérisation à 56°C pendant 48 heures, des coupes ultra-fines de 70 nm sont réalisées sur un ultra-microtome Reichert-Yung, contrastées à l'acétate d'uranyle et au nitrate de plomb et observées au microscope électronique à transmission JEM1010 (JEOL, Japon).

### **3.8 Extraction des protéines totales**

Les cellules sont lavées au PBS 1X et centrifugées. Un culot de 5x10<sup>6</sup> cellules est repris dans du tampon de lyse MPER (Mammalian Protein Extraction Reagent, Pierce, Belgique) additionné d'un mélange d'inhibiteurs de phosphatases : Phosphostop (Roche), orthovanadate 0,8 mM (Sigma), NaF 4,1 mM et d'inhibiteurs de protéases : « complete » (Roche) et Fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) 1,65 mM (Sigma). L'ensemble est placé sous agitation forte pendant 15 minutes à 4°C puis centrifugé à 18 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les protéines totales sont ensuite stockées à -80°C. Avant leur analyse, les extraits protéiques sont dosés par la méthode de Bradford en utilisant le réactif BioRad (BioRad Laboratories, Belgique) avec une gamme étalon de SAB.

### 3.9 Extraction des facteurs nucléaires et cytoplasmiques

Afin d'extraire les facteurs nucléaires et cytoplasmiques, un culot de  $4 \times 10^6$  cellules est remis en suspension par agitation douce dans 400  $\mu\text{L}$  de tampon A extemporané (Tableau 4), puis incubé 15 minutes à  $4^\circ\text{C}$ . Les cellules sont ensuite lysées avec 25  $\mu\text{L}$  d'Igepal 10% qui est un détergeant non dénaturant. Puis l'ensemble est agité vigoureusement pendant 10 secondes. Après une centrifugation de 30 secondes à 15 000 g à  $4^\circ\text{C}$ , le surnageant contenant les facteurs cytoplasmiques est récupéré tandis que le culot contenant les noyaux est repris dans 50  $\mu\text{L}$  de tampon C extemporané (Tableau 4), puis soumis à une agitation horizontale à  $4^\circ\text{C}$  pendant 15 minutes. L'ensemble est ensuite centrifugé à  $4^\circ\text{C}$  pendant 5 minutes à 12 000 g, puis le surnageant contenant les facteurs nucléaires est récupéré. Les facteurs nucléaires et cytoplasmiques sont dosés par le technique de Bradford et conservés à  $-80^\circ\text{C}$ .

### 3.10 Western Blot

Cinq à 50  $\mu\text{g}$  de protéines sont dénaturées dans une solution contenant du  $\beta$ -mercaptoéthanol (5% v/v), du bleu de bromophénol (0,005% p/v), du sodium dodecyl sulfate (SDS) 10% (4% p/v), du tampon tris-HCl pH 6,8 (0,125 M) et du glycérol 100% (20% v/v), puis chauffé pendant 5 minutes à  $99^\circ\text{C}$ . L'ensemble est ensuite déposé sur un gel « Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) » constitué d'un gel de concentration à 4% et d'un gel de séparation à 7, 10 ou 12% selon la protéine à étudier. Les protéines sont séparées en fonction de leur masse moléculaire en migrant dans le gel sous l'effet d'un champ électrique (environ 1h à 20 mA). La migration est réalisée dans du tampon d'électrophorèse 1X (Tris 2,5 mM, Glycine 19,2 mM, SDS 0,01%). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF, GE Healthcare) préalablement activée par du méthanol. Le transfert se fait dans un champ électrique à l'aide d'un tampon de transfert 1X (Tris 2,5 mM, Glycine 19,2 mM, méthanol 2%) (1h à 100 V). La membrane est ensuite incubée dans du PBS-Tween (PBS-T) (NaCl 137 mM, KCl 2,6 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  3,1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM, Tween 0,10%) complémenté de 5% de lait ou de SAB afin de saturer la membrane et d'empêcher les fixations non spécifiques des anticorps utilisés. La membrane est ensuite incubée en présence d'un anticorps primaire (IgG) spécifique de la protéine recherchée, dans du PBS-T à 5% de lait ou de SAB, puis en présence d'un anticorps secondaire anti-IgG (Tableau 5), couplé à la peroxydase de Raifort (« Horseradish peroxydase », HRP). Plusieurs lavages sont réalisés dans du PBS-T entre l'ajout de l'anticorps primaire et de l'anticorps secondaire. La peroxydase permet de révéler la protéine recherchée sur la membrane grâce au kit ECL+ (GE Healthcare) contenant les substrats de la peroxydase. La chimioluminescence est détectée par l'appareil Imagequant Las4000 mini (GE Healthcare).

**Tableau 4 : Composition des tampons pour l'extraction des facteurs nucléaires et cytoplasmiques**

Réactifs	Tampon A	Tampon C
HEPES pH 7,9	10 mM	20 mM
KCl	10 mM	/
NaCl	/	400 mM
EDTA pH 8	0,1 mM	1 mM
EGTA	0,1 mM	1 mM
DTT	1 mM	1 mM
PMSF	0,5 mM	0,5 mM
Complete	1X	1X
Orthovanadate	1 mM	1 mM
NaF	5 mM	5 mM
Phosphostop	1X	1X
Glycérol	/	20%
Eau ultra-pure	Qsp 10 mL	Qsp 10 mL

**Tableau 5 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les Western Blot**

Protéine cible	Poids moléculaire	Saturation	Anticorps primaire	Anticorps secondaire
Actine $\beta$	42 kDa	<i>PBS-T - 5% lait Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>Réf: A5441 Sigma Monoclonal Dilution: 1/5000 Incubation: 1h, T. amb</i>	<i>anti-souris Réf: sc-2005 Dilution: 1/10000</i>
P-AKT S473	60 kDa	<i>PBS-T - 5% BSA Incubation: 1h, T.amb</i>	<i>Réf: #9271L Polyclonal Dilution: 1/1000 Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>anti-lapin Réf: sc-2313 Dilution: 1/2000</i>
AKT	60 kDa	<i>PBS-T - 5% lait Incubation: 1h, T.amb</i>	<i>Réf: #9272s Polyclonal Dilution: 1/1000 Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>anti-lapin Réf: sc-2313 Dilution: 1/2000</i>
Atg5	60 kDa	<i>PBS-T - 5% lait Incubation: 1h, T.amb</i>	<i>Réf: #2630s Polyclonal Dilution: 1/1000 Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>anti-lapin Réf: sc-2313 Dilution: 1/4000</i>
Atg7	77 kDa	<i>PBS-T - 5% lait Incubation: 1h, T.amb</i>	<i>Réf: #2631s Polyclonal Dilution: 1/1000 Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>anti-lapin Réf: sc-2313 Dilution: 1/4000</i>
P-Atg13 Ser355	72 kDa	<i>PBS-T - 5% BSA Incubation: 1h, T.amb</i>	<i>Réf: #43533S Polyclonal Dilution: 1/1000 Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>anti-lapin Réf: sc-2313 Dilution: 1/2000</i>
Atg13	72 kDa	<i>PBS-T - 5% lait Incubation: 1h, T.amb</i>	<i>Réf: #13273 Polyclonal Dilution: 1/1000 Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>anti-lapin Réf: sc-2313 Dilution: 1/2000</i>
Bécline 1	52 kDa	<i>PBS-T - 5% lait Incubation: 1h, T.amb</i>	<i>Réf: #3738s Polyclonal Dilution: 1/1000 Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>anti-lapin Réf: sc-2313 Dilution: 1/4000</i>
GATA-1	47 kDa	<i>PBS-T - 5% ASB Incubation: 1h, T. amb</i>	<i>Réf: C-20 sc-1233X Polyclonal Dilution: 1/5000 Incubation:12h, 4°C</i>	<i>anti-chèvre Réf: sc-2020 Dilution: 1/3000</i>
GATA-2	50 kDa	<i>PBS-T - 5% lait Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>Réf: H-116 sc-9008 Polyclonal Dilution: 1/8000 Incubation: 1h, T.amb</i>	<i>anti-lapin Réf: sc-2313 Dilution: 1/4000</i>
$\alpha$ -globine	10 kDa	<i>PBS-T - 5% lait Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>Réf: D16 sc-31110 Polyclonal Dilution: 1/2000 Incubation: 1h, T. amb</i>	<i>anti-chèvre Réf: sc-2020 Dilution: 1/5000</i>



Protéine cible	Poids moléculaire	Saturation	Anticorps primaire	Anticorps secondaire
$\beta$ -globine	16kDa	<i>PBS-T - 5% lait Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>Réf: 37-8 sc-21757 Monoclonal Dilution: 1/2000 Incubation: 1h, T. amb</i>	<i>anti-souris Réf: sc-2005 Dilution: 1/5000</i>
$\gamma$ -globine	18kDa	<i>PBS-T - 5% lait Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>Réf: 57-1 sc-21756 Monoclonal Dilution: 1/8000 Incubation: 1h, T. amb</i>	<i>anti-souris Réf: sc-2005 Dilution: 1/10000</i>
LC3	17-19 kDa	<i>PBS-T - 5% lait Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>Réf: #2775s Polyclonal Dilution: 1/1000 Incubation: 2h, T. amb</i>	<i>anti-lapin Réf: Amersham IgG horseradish peroxydase linked Dilution: 1/25000</i>
P-mTOR S2448	259 kDa	<i>PBS-T - 5% lait Incubation: 1h, T.amb</i>	<i>Réf: #2971 Polyclonal Dilution: 1/1000 Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>anti-lapin Réf: sc-2313 Dilution: 1/2000</i>
mTOR	259 kDa	<i>PBS-T - 5% lait Incubation: 1h, T.amb</i>	<i>Réf: #2972 Polyclonal Dilution: 1/1000 Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>anti-lapin Réf: sc-2313 Dilution: 1/4000</i>
P-PI3K p85 Y458	85 kDa	<i>PBS-T - 5% lait Incubation: 1h, T.amb</i>	<i>Réf: #4228S Polyclonal Dilution: 1/1000 Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>anti-lapin Réf: sc-2313 Dilution: 1/2000</i>
PI3K p85	85 kDa	<i>PBS-T - 5% lait Incubation: 1h, T.amb</i>	<i>Réf: #2972 Polyclonal Dilution: 1/1000 Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>anti-lapin Réf: sc-2313 Dilution: 1/2000</i>
PU.1	40 kDa	<i>PBS-T - 5% lait Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>Réf: Spi-1 T-21 sc-352 Polyclonal Dilution: 1/500 Incubation:1h, T.amb</i>	<i>anti-lapin Réf: sc-2313 Dilution: 1/1000</i>
RUBICON	130 kDa	<i>PBS-T - 5% ASB Incubation: 1h, T.amb</i>	<i>Réf: ab92388 Polyclonal Dilution: 1/2000 Incubation:1h, T.amb</i>	<i>anti-lapin Réf: sc-2313 Dilution: 1/4000</i>
SphK1	45 kDa	<i>PBS-T - 5% lait Incubation: 1h, T. amb</i>	<i>Réf: #3297 Polyclonal Dilution: 1/1000 Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>anti-lapin Réf: sc-2313 Dilution: 1/1000</i>
SQSTM1/p62	62 kDa	<i>PBS-T - 5% lait Incubation: 1h, T. amb</i>	<i>Réf: #5114s Polyclonal Dilution: 1/1000 Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>anti-lapin Réf: sc-2313 Dilution: 1/4000</i>
P-ULK1 S758	150 kDa	<i>PBS-T - 5% lait Incubation: 1h, T. amb</i>	<i>Réf: #6888 Polyclonal Dilution: 1/1000 Incubation: 12h, 4°C</i>	<i>anti-lapin Réf: sc-2313 Dilution: 1/1000</i>

### 3.11 Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux se fait à partir d'un culot de  $2 \times 10^6$  cellules. Tout le matériel utilisé pour l'extraction doit être traité contre les RNases. Le culot est repris dans du PBS 1X, puis l'ensemble est centrifugé pendant 7 minutes à 350 g. La lyse des cellules est permise grâce à l'ajout sur le culot de 1 mL de TRIzol® (Invitrogen, Belgique). L'ajout de 0,2 mL de 1-bromo-3-chloropropane (Sigma) suivi d'une centrifugation de 15 minutes à 12 000 g permet de séparer l'ADN des ARN totaux. Les ARN contenus dans la phase aqueuse vont être précipités dans 0,5 mL d'isopropanol. Une centrifugation 1h à 12 000 g à 4°C va permettre de former des culots d'ARN qui vont ensuite être lavés dans de l'éthanol à 75% puis repris dans de l'eau ultra-pure traitée contre les ARNases afin d'être dosés par spectrophotométrie (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer). Les ARN obtenus sont stockés à -80°C.

### 3.12 Transcription inverse

La SuperScript II® (Invitrogen) est une ADN polymérase-ARN dépendante (transcriptase inverse) qui va permettre de synthétiser des ADN complémentaires (ADNc) à partir d'un extrait d'ARN contenant des ARNm poly-adénylés capables de s'hybrider avec des oligo(dT). Cette enzyme a été modifiée de manière à perdre l'activité RNase H afin que les ARN ne soient pas dégradés avant la synthèse d'ADNc. Les oligo(dT) (500 µg/mL) et le mix de désoxynucléotides triphosphates (dNTP, 10 mM de chaque) sont ajoutés à 2 µg d'ARN totaux et complétés avec de l'eau ultra pure. L'ensemble est chauffé pendant 5 minutes à 65°C. Le dithiothréitol (DTT) 0,1 M, le tampon 5X First-strand et l'anti-RNase RNaseOUT® (40 U/µL) sont ajoutés et incubés à 42°C pendant 2 minutes. La RNaseOUT® est une enzyme qui va se lier à différentes ARNases et empêcher ainsi leur action. La transcriptase inverse SuperScript II® (200 U/µL) est ajoutée au mélange qui est incubé pendant 50 minutes à 42°C. La réaction est ensuite bloquée en incubant le mélange 15 minutes à 70°C. La RNase H (2 U/µL) est ajoutée puis incubée pendant 20 minutes à 37°C afin de dégrader les ARN dans les duplexes ARN/ADNc. Les ADNc obtenus sont stockés à -20°C. Contrairement aux ARNm, les microARN (miR) ne possèdent pas de queue poly(A), d'où l'utilisation du kit miScript reverse transcription (Qiagen, Pays-Bas) qui contient le miScript RT mix composé d'une poly(A) polymérase qui va d'abord poly-adényler les miR et une transcriptase inverse, qui, grâce à une amorce poly d(T) va réaliser la transcription inverse afin d'obtenir des ADNc qui vont servir de matrice pour la PCR en temps réel.

### 3.13 PCR en temps réel

Les ADNc sont ajoutés aux amorces nucléotidiques spécifiques du gène d'intérêt (Tableau 6) ou du gène de référence dilués au mix Power SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Belgique) qui contient l'AmpliTaq Gold® ADN polymérase, le tampon de réaction, les dNTP et le fluorochrome SYBR green. Le mélange est ensuite aliquoté à 20 µL par puits sur une microplaque de 96 puits. L'ensemble est centrifugé puis placé dans l'appareil 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystem) qui va réaliser les différents cycles d'amplification. Le gène de l'actine β est utilisé comme contrôle interne car son expression n'est pas modifiée par le traitement. Pour les ADNc issus d'une transcription inverse des miR, le kit utilisé est le miScript SYBR green PCR kit (Qiagen) contenant l'ADN polymérase HotStarTaq, le tampon de réaction, le SYBR green, les dNTP. Une sonde universelle ainsi que les amorces nucléotidiques spécifiques des gènes d'intérêt sont ensuite ajoutés (Tableau 7). Le mélange est ensuite aliquoté à 25 µL par puits sur une microplaque de 96 puits. L'ensemble est centrifugé puis placé dans l'appareil 7300 Real Time PCR System qui va réaliser les différents cycles d'amplification. Le gène RNU1A est utilisé comme contrôle interne. Les données obtenues sont ensuite analysées par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

### 3.14 Analyses statistiques

Les analyses statistiques des résultats sont effectuées en utilisant le logiciel GraphPad Prism 6. Les expériences sont réalisées au moins 3 fois et de manière indépendante. Les résultats correspondent à la moyenne et les barres d'erreurs à la déviation standard à la moyenne. Les groupes ont été comparés en utilisant le test T (pour une variable à deux niveaux), Anova 1 (pour une variable et plus de deux niveaux) et Anova 2 lorsqu'il y a 2 variables, suivi de tests post-hocs (Dunnet, Holm-Sidak) si nécessaire. Les résultats sont considérés statistiquement différents pour des valeurs de  $p < 0,0001$  : \*\*\*\*,  $p < 0,001$  : \*\*\*,  $p < 0,01$  : \*\* et  $p < 0,05$  : \*.

**Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR en temps réel**

Gène	Sens 5'-3'	Antisens 5'-3'
Globine $\alpha$	TCAAGCTCCTAAGCCACTGC	AGAAGCCAGGAACTTGTCCA
Globine $\beta$	CTGGGCAGATTACTGGTGGT	TTAGGGTTGCCATAACAGC
Globine $\gamma$	CCCAGAGGTTCTTTGACAGC	GGAAGTCAGCACCTTCTTGC
EpoR	CTCA TCCTCGTGGTCA TCCT	CAGGCCAGA TCTTCTGCTTC
SphK1	CTTGCACTCTTCCGGAGTC	GCTCAGTGAGCATCAGCGTG
MAP1LC3B	ACCATGCCGTCGGAGAAG	ATCGTTCTATTATCACCGGGATTTT
GABARAPL1	TTGTCAACAACACCATCCCTCC	TCCAACCACTCATTTCATAGAC
GATE-16	GTGTTCTCTCCGCTGTAGGC	AGGCGATCTTCTGTTTGTG
Atg4B	GCCGAGATTGGAGGTG	GCCTATGGACTTGCCTTC
LAMP1	CTGCCTTTAAAGCTGCCAAC	TGTTCTCGTCCAGCAGACAC
Atg3	CTGGAAGTGGCTGAGTACCTG	CTTCCCCTGTAGCCCATTGC
Atg7	AGGAGATTCAACCAGAGACC	GCACAAGCCCAAGAGAGG
Atg5	GCATCAAGTTCAGCTCTTCCTTG	TGCATCCTTAGATGGACAGTGC
Atg14	ATGAGCGTCTGGCAAATCTT	CCCATCGTCCTGAGAGGTAA
ULK1	TCGAGTTCTCCCGCAAGG	CGTCTGAGACTTGGCGAGGT
FOXO3A	AGTTCCTCATTCTGGACCC	CTTCAAGGATAAGGGCGACA

**Tableau 7 : Séquences des miR analysés par PCR en temps réel**

ARN	Séquences des miR
miR-144	5'- UACAGUAUAGAUGAUGUACU -3'
miR-451	5'- AAACCGUUACCAUACUGAGUU -3'
miR-223	5'- UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA -3'
miR-221	5'- AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC -3'
miR-15a	5'- UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG -3'
miR-146a	5'- UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU -3'
miR-23a	5'- AUCACAUUGCCAGGGAUUUC -3'
miR-16	5'- UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG -3'
miR-155	5'- UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU -3'
miR-126	5'- CAUUAUUACUUUUGGUACGCG -3'
miR-486	5'-UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG-3'

## **4 Résultats**

### **4.1 Effet du TNF $\alpha$ sur l'activation des sphingomyélinases**

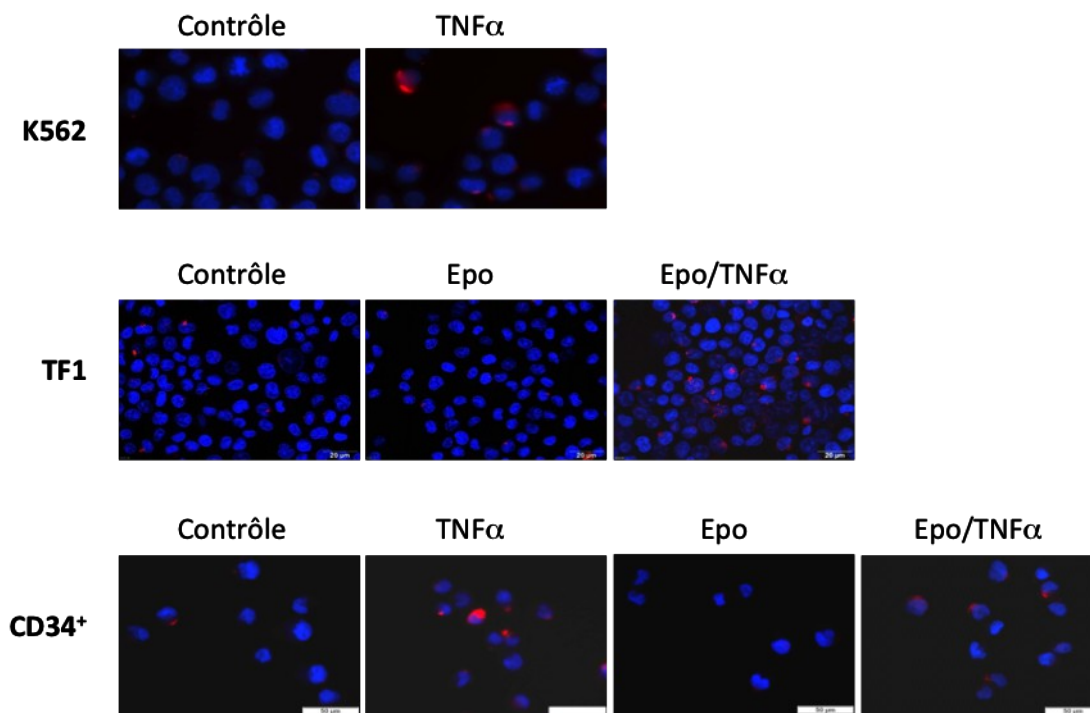
Afin de mettre en évidence la capacité de nos différents modèles cellulaires à produire des céramides, nous avons étudié l'effet du TNF $\alpha$  sur l'activation des SMases. Lorsqu'elles sont activées, les SMases catalysent la formation rapide de céramides que l'on peut marquer grâce à un anticorps anti-céramide. Les CSPH CD34<sup>+</sup> et les cellules TF-1 et K562 non traitées ou traitées par 20 ng/mL de TNF $\alpha$  pendant 2 minutes puis induites à se différencier en cellules érythroïdes en utilisant 2 U/mL d'Epo pour les cellules CD34<sup>+</sup> et 10 U/mL d'Epo pour les TF-1 ont été marquées par un anticorps primaire anti-céramide et un anticorps secondaire fluorescent. Les cellules marquées ont été observées au microscope à fluorescence au grossissement 20X (Figure 25). Les résultats obtenus montrent que le TNF $\alpha$  favorise la formation de plateformes (zones) riches en céramides en présence ou en absence d'Epo. Ces plateformes caractéristiques apparaissent en rouge alors que les noyaux sont colorés en bleu par le réactif de Hoechst.

### **4.2 Effet des céramides sur l'érythropoïèse**

#### **4.2.1 Effet des céramides de synthèse C2 sur l'expression des marqueurs érythroïdes dans les cellules CD34<sup>+</sup>**

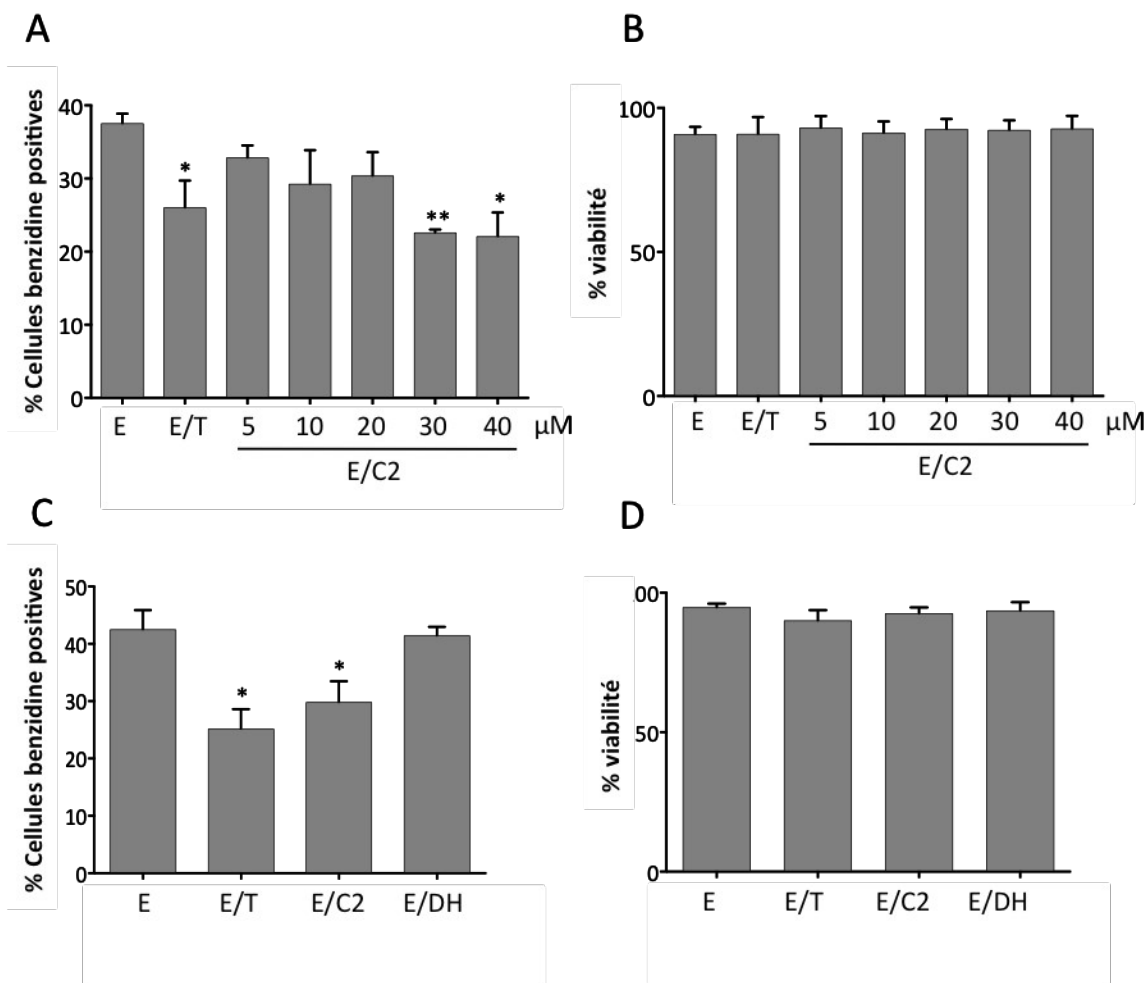
##### **a. Effet sur la production d'hémoglobine**

Afin d'étudier l'effet des céramides sur l'érythropoïèse, nous avons utilisé un analogue synthétique des céramides, le céramide C2 (C2-cer), qui possède une chaîne plus courte que les céramides naturels, biologiquement actif et capable de diffuser à travers les membranes biologiques. Dans un premier temps, les cellules CD34<sup>+</sup> ont été isolées à partir de SCO puis traitées avec 20 ng/mL de TNF $\alpha$  comme contrôle positif d'inhibition de la différenciation érythroïde ou avec 5, 10, 20, 30, 40  $\mu$ M de C2-cer puis stimulées après une heure avec de l'Epo (2 U/mL). Après 4 jours, l'hémoglobination des cellules a été analysée par un test de coloration à la benzidine et la viabilité des cellules a été évaluée par un test d'exclusion au bleu de Trypan. Les résultats du test de coloration à la benzidine (Figure 26A) montrent que le TNF $\alpha$  diminue de 20% le nombre de cellules contenant de l'Hb en comparaison avec les cellules traitées avec l'Epo. Les C2-cer ont un effet similaire et diminuent le pourcentage de cellules produisant de l'Hb de manière dépendante de la concentration sans affecter la viabilité cellulaire (Figure 26B).



**Figure 25 : Effet du TNF $\alpha$  sur la formation de céramides**

Les cellules K562, TF-1 et CD34<sup>+</sup> non traitées ou traitées par 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T) et induites à se différencier par 10 U/mL d'Epo (E) pour les TF-1 et par 2 U/mL pour les CD34<sup>+</sup> ont été fixées puis marquées par un anticorps primaire anti-céramide et un anticorps secondaire fluorescent (rouge) puis les noyaux des cellules ont été marqués au réactif de Hoechst (bleu) et observées au microscope à fluorescence. Les images ont été prises au grossissement 20X et sont représentatives de trois expériences indépendantes.



**Figure 26 : Effet des céramides C2 sur la production d'hémoglobine dans les cellules CD34<sup>+</sup>**

Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo (E) ont été traitées avec 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T) ou différentes concentrations de céramides C2 pendant 4 jours.

**A.** L'effet des traitements sur la différenciation érythroïde a été évalué par un test de coloration à la benzidine. Le diagramme correspond au pourcentage de cellules positives à la benzidine par rapport au nombre total de cellules.

**B.** La viabilité des cellules a été évaluée par un test d'exclusion au bleu de Trypan.

Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo (E) ont été traitées par 20 ng/mL de TNF $\alpha$ , 30  $\mu$ M de céramide C2 (C2) ou 30  $\mu$ M de dihydrocéramide C2 (DH) pendant 4 jours.

**C.** L'effet des traitements sur la différenciation érythroïde a été évalué par un test de coloration à la benzidine. Le diagramme correspond au pourcentage de cellules positives à la benzidine par rapport au nombre total de cellules.

**D.** La viabilité des cellules a été évaluée par un test d'exclusion au bleu de Trypan.

Les données représentent la moyenne de 3 (A, B) ou 4 (C, D) expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA 1 en mesures répétées suivi du test de Dunnet (Graphpad Prism). (\* : p<0,05; \*\* : p<0,01).



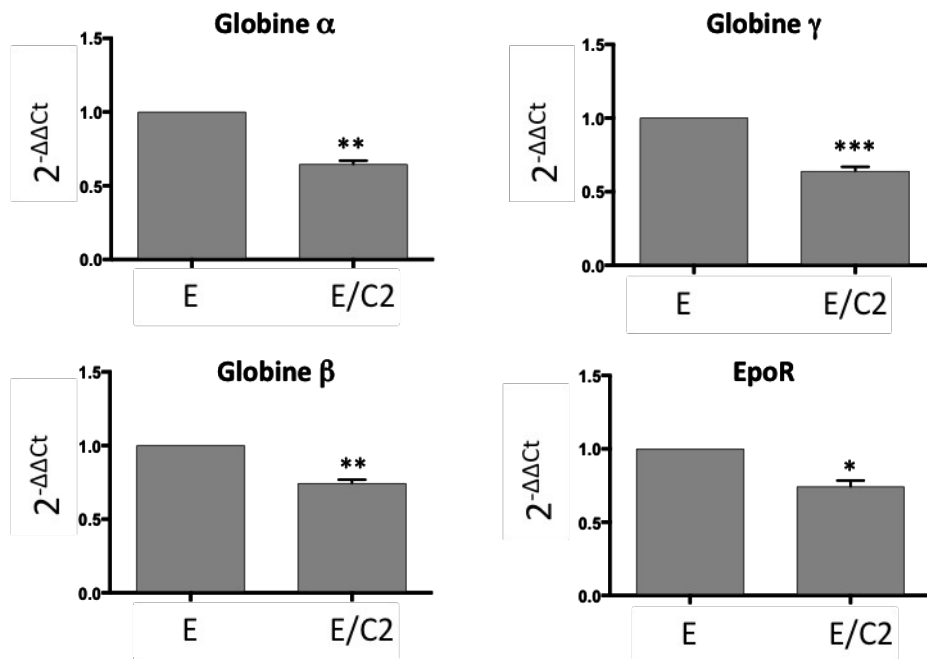
De plus, nous avons vérifié l'effet des précurseurs de céramides, les dihydrocéramides C2 (DH) qui ne possèdent pas de double liaison entre les carbones 4 et 5. Les cellules CD34<sup>+</sup> ont été traitées avec 30 µM de C2-cer ou de DH ou 20 ng/mL de TNFα puis stimulées après une heure avec 2 U/mL d'Epo pendant 4 jours. Les résultats du test de coloration à la benzidine (Figure 26C) montrent que, contrairement au TNFα et aux C2-cer, les DH n'ont pas d'effet significatif sur l'induction de la différenciation des CSPH CD34<sup>+</sup> par l'Epo ni sur la viabilité cellulaire (Figure 26D). Nos résultats confirment que les céramides, mais pas leurs précurseurs (DH) dans la voie *de novo*, sont capables d'inhiber la différenciation érythroïde des CSPH CD34<sup>+</sup>.

### **b. Effet sur l'expression des globines**

L'effet des céramides a ensuite été vérifié sur l'expression des globines comme protéines spécifiques des cellules érythroïdes et principaux constituants de l'Hb ainsi que sur l'expression l'EpoR qui est présent à la surface des cellules érythroïdes. Les CSPH CD34<sup>+</sup> ont été traitées avec 20 ng/mL de TNFα ou 30 µM de C2 puis stimulées après une heure avec 2 U/mL d'Epo pendant 4 jours. L'expression des ARNm de globines α, β et γ et de l'EpoR a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats obtenus montrent que les C2-cer sont capables de diminuer l'expression des trois types de globines ainsi que celle de l'EpoR en accord avec la diminution du pourcentage de cellules hémoglobinisées (Figure 27).

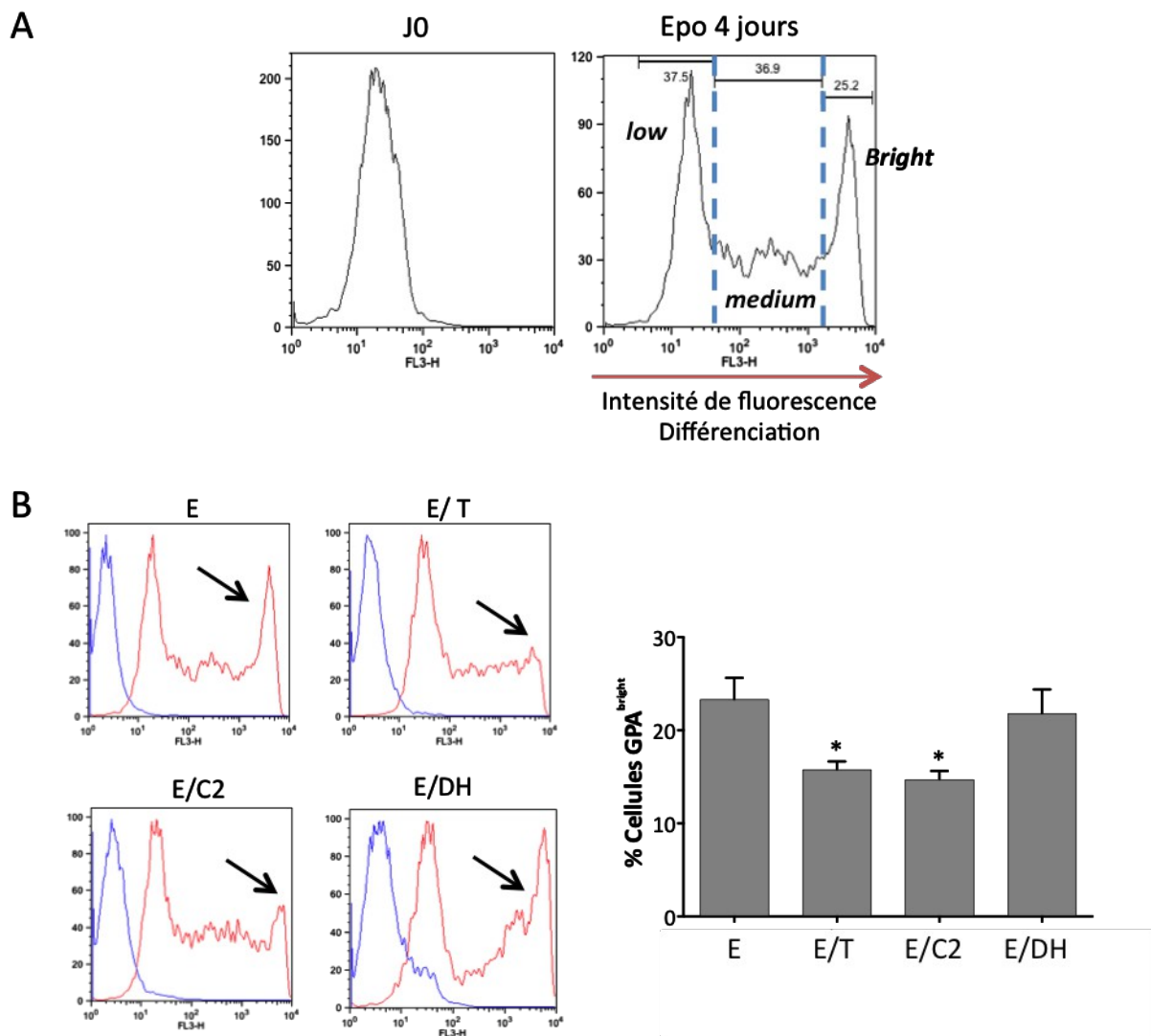
### **c. Effet sur la glycophorine A**

Nous avons également étudié l'expression de la GPA qui est un marqueur membranaire spécifique des cellules érythroïdes. Lorsque les cellules sont induites à se différencier par l'Epo, l'analyse par cytométrie de flux permet d'identifier trois populations cellulaires qui expriment différemment la GPA en fonction du stade de différenciation (Figure 28A) : la population qui exprime le moins la GPA et qui est donc peu différenciée est appelée GPA<sup>dim</sup> ou GPA<sup>low</sup>, la population intermédiaire est appelée GPA<sup>medium</sup> et les cellules les plus différenciées qui expriment fortement la GPA sont appelées GPA<sup>bright</sup> ou GPA<sup>high</sup>. Les cellules CD34<sup>+</sup> ont été traitées avec 20 ng/mL de TNFα ou avec 30 µM de C2-cer ou de DH puis stimulées après une heure avec de l'Epo (2 U/mL). Après 4 jours, les cellules ont été analysées par cytométrie de flux pour l'expression de la GPA. L'analyse des résultats de cytométrie par le logiciel FlowJo montre que l'Epo induit la différenciation érythroïde en stimulant la formation des trois populations cellulaires dont 25,2% de cellules GPA<sup>bright</sup> après 4 jours de traitement alors que seule la population GPA<sup>dim</sup> est observée dans les cellules contrôles à J0 (Figure 28A). Le traitement par 20 ng/mL de TNFα est capable de diminuer de 50% la formation de la population la plus différenciée GPA<sup>bright</sup>. De la même manière,



**Figure 27 : Effet des céramides C2 sur l'expression des globines et du récepteur à l'Epo dans les cellules CD34<sup>+</sup>**

Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo (E) ont été traitées par 30 μM de céramides C2 (C2) pendant 4 jours. Les ARN totaux ont été extraits puis l'expression des globines α, β et γ et de l'EpoR a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats de la PCR en temps réel ont été normalisés par rapport au gène de l'actine β et calculés par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et ont été analysées par un test de Student pour échantillons appariés (Graphpad Prism). (\* : p<0,05 ; \*\* : p<0,01, \*\*\* : p<0,001).



**Figure 28 : Effet des céramides C2 sur l'expression de la glyco-phorine A dans les cellules CD34<sup>+</sup>**

**A.** Les cellules CD34<sup>+</sup> ont été analysées au jour 0 (J0) et après 4 jours de traitement à l'Epo (E). L'effet du traitement sur l'expression de la glyco-phorine A (GPA) a été évalué par cytométrie de flux. Les résultats ont été analysés avec le logiciel FlowJo. **B.** Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo (E) ont été traitées avec 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T), 30  $\mu$ M de céramides C2 (C2) ou 30  $\mu$ M de dihydrocéramide C2 (DH) pendant 4 jours. L'effet des traitements sur la différenciation érythroïde a été évalué par cytométrie de flux grâce à l'analyse du marqueur GPA. Les résultats ont été analysés avec le logiciel FlowJo. Le diagramme correspond au pourcentage de cellules GPA<sup>bright</sup> par rapport au nombre de cellules total.

Les graphiques montrent une expérience représentative parmi 4. Les flèches indiquent la population GPA<sup>bright</sup>. Les données représentent la moyenne de 4 expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA 1 en mesures répétées suivi du test de Dunnet (Graphpad Prism). (\* : p<0,05).

nous observons une diminution de la population GPA<sup>bright</sup> dans les cellules traitées avec 30  $\mu$ M de C2-cer du même ordre que pour le TNF $\alpha$  (Figure 28B). Le traitement des CSPH par 30  $\mu$ M de DH n'a pas d'effet sur l'expression de la GPA par rapport aux cellules traitées à l'Epo seule.

#### **4.2.2 Effet des céramides C2 et des dihydrocéramides C2 sur la différenciation érythroïde des cellules érythroleucémiques TF-1 et K562**

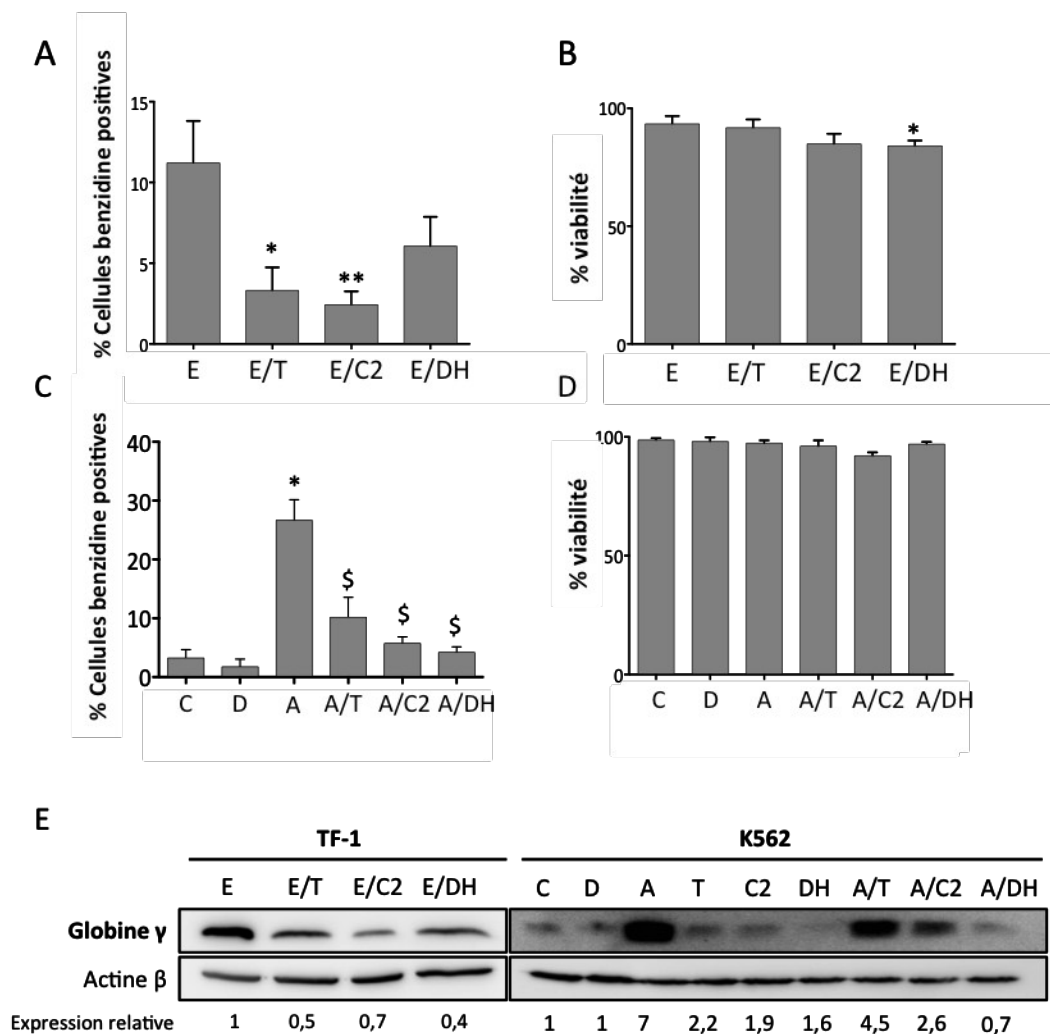
Afin de confirmer l'effet des C2-cer et des DH sur la différenciation érythroïde nous avons utilisé la lignée TF-1, qui présente l'intérêt de répondre à l'Epo ainsi que la lignée K562 qui peut être induite à se différencier indépendamment de l'Epo par l'Aclacinomycine (Acla) qui induit l'expression du facteur GATA-1. Les cellules TF-1 ont été traitées pendant trois jours avec 10 U/mL d'Epo et les cellules K562 ont été traitées pendant trois jours avec 10 nM d'Acla, chacune en co-traitement avec 20 ng/mL de TNF $\alpha$  ou 30  $\mu$ M de C2-cer ou 30  $\mu$ M de DH.

##### **a. Effet sur la production d'hémoglobine**

Les résultats montrent que le TNF $\alpha$  et les C2-cer réduisent de plus de 50% le taux de cellules positives à la benzidine induites par l'Epo et l'Acla. Contrairement à leur effet sur les CSPH CD34<sup>+</sup>, les DH ont tendance à diminuer le nombre de cellules positives à la benzidine, suggérant que la voie *de novo* pourrait être active dans les cellules érythroleucémiques conduisant à la désaturation des DH en céramide ou que les DH par eux-mêmes pourraient jouer un rôle dans l'inhibition de l'érythropoïèse dans les cellules TF-1 et K562 (Figure 29A et C). De plus, les C2-cer et les DH ont tendance à diminuer légèrement la viabilité cellulaire (Figure 29B et D). Le traitement au DMSO, utilisé comme contrôle montre qu'il n'induit pas la formation de cellules positives à la benzidine.

##### **b. Effet sur l'expression des globines**

Des extraits cytoplasmiques ont été réalisés et l'expression de la globine  $\gamma$  a été analysée par Western Blot. Les résultats obtenus montrent que le TNF $\alpha$ , les C2-cer et les DH sont capables de diminuer l'expression de la globine  $\gamma$  dans les cellules TF-1 et K562 (Figure 29E). Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par le test de coloration à la benzidine.



**Figure 29 : Effet des céramides C2 sur la production d'hémoglobine dans les cellules TF-1 et K562**

Les cellules TF-1 stimulées par l'Epo (E) ou les cellules K562 induites par l'Acla (A) ont été traitées par 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T), 30  $\mu$ M céramide C2 (C2) ou 30  $\mu$ M de dihydrocéramide C2 (DH) pendant 3 jours.

**A, C.** L'effet des traitements sur la différenciation érythroïde a été évalué par un test de coloration à la benzidine. Le pourcentage de cellules benzidine positives correspond au nombre de cellules positives à la benzidine sur le nombre de cellules totales.

**B, D.** La viabilité des cellules a été évaluée par un test d'exclusion au bleu de Trypan. **E.** Les Western Blots ont été réalisés à partir d'extraits cytoplasmiques. L'actine  $\beta$  est utilisée comme contrôle interne de dépôt des échantillons. L'expression relative correspond au rapport de l'intensité de la bande correspondant à la protéine étudiée sur celle de l'actine  $\beta$ , le contrôle étant normalisé à un. Les résultats montrent une expérience représentative parmi 3.

Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA 1 en mesures répétées suivies du test de Dunnet (Graphpad Prism).(\*,\$ :  $p < 0,05$ ,\*\* :  $p < 0,01$ ).

### 4.2.3 Effet de la sphingomyélinase bactérienne de *S. aureus* sur l'érythropoïèse

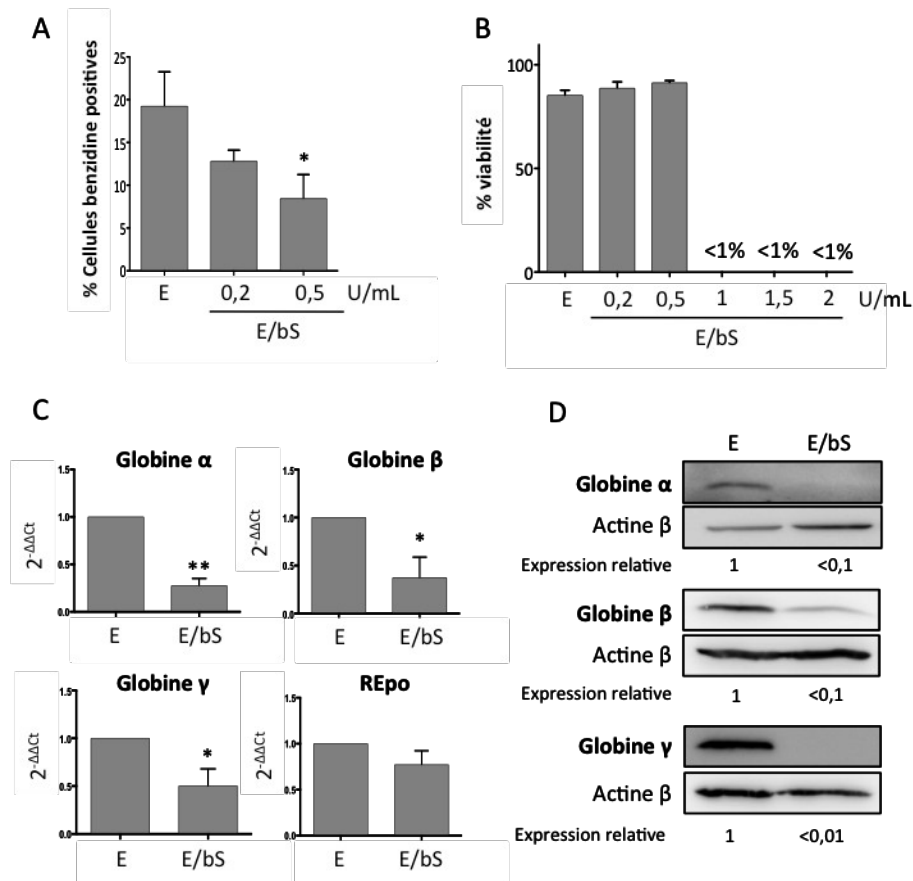
#### a. Dans les cellules CD34<sup>+</sup>

Nous avons montré que les C2-cer qui sont synthétiques et apportés de manière exogène, sont capables d'inhiber l'érythropoïèse. Pour vérifier que les céramides endogènes ont également cette capacité, nous avons provoqué la synthèse de céramides à partir de la sphingomyéline contenue dans la membrane plasmique en traitant les cellules avec la sphingomyélinase bactérienne (bSMase). Les cellules CD34<sup>+</sup> ont été traitées avec 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ou 2 U/mL de bSMase puis stimulées après une heure avec 2 U/mL d'Epo pendant 4 jours. Les tests de viabilité montrent un effet cytotoxique important lorsque les cellules sont traitées à des concentrations supérieures à 0,5 U/mL (Figure 30B). Les résultats du test de coloration à la benzidine montrent que les traitements par la bSMase aux concentrations subtoxiques sont capables de diminuer le pourcentage de cellules positives à la benzidine (Figure 30A) de manière dépendante de la concentration. Ceci suggère que les céramides endogènes sont effectivement capables d'inhiber la différenciation comme observé avec les C2-cer. Comme le TNF $\alpha$ , la bSMase à 0,5 U/mL diminue de 50% le nombre de cellules contenant de l'Hb par rapport aux cellules traitées avec l'Epo. L'expression des globines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  ainsi que de l'EpoR a été analysée par PCR. Les cellules CD34<sup>+</sup> ont été traitées avec 0,5 U/mL de bSMase et 2 U/mL d'Epo pendant 4 jours. Les résultats obtenus montrent que la bSMase est capable de diminuer significativement l'expression des trois types de globines mais pas l'expression du récepteur à l'Epo (Figure 30C). Des extraits cytoplasmiques ont été réalisés sur les cellules CD34<sup>+</sup> traitées avec 0,5 U/mL de bSMase et stimulées après une heure avec 2 U/mL d'Epo pendant 4 jours. L'expression des globines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  a été analysée par Western Blot. Les résultats obtenus montrent que la bSMase est capable de diminuer l'expression des globines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  dans les cellules CD34<sup>+</sup> (Figure 30D). Ces résultats sont en accord avec le test de coloration à la benzidine et confirment l'impact des céramides endogènes sur la différenciation érythroïde des CSPH CD34<sup>+</sup>.

#### b. Dans les cellules TF-1 et K562

Les cellules TF-1 stimulées avec 2 U/mL d'Epo et les cellules K562 induites ou non par l'Acla ont été traitées avec 0,5 U/mL de bSMase pendant 3 jours. Les tests de viabilité ne montrent pas d'effet cytotoxique avec les différents traitements (Figure 31B et D). De manière similaire aux CSPH CD34<sup>+</sup>, les tests de coloration à la benzidine montrent que les céramides générés par la bSMase sont capables de prévenir l'hémoglobinisation des cellules TF-1 (Figure 31A). Cependant, contrairement aux traitements avec les C2-cer ou le TNF $\alpha$ , la bSMase n'a pas d'effet sur l'induction de différenciation des cellules K562 par l'Acla. Les tests de coloration à la benzidine montrent en effet

que le pourcentage de cellules benzidine positives après traitement (A) est équivalent aux cellules cotraitées (A/bS) (Figure 31C). Ceci suggère que les céramides ne sont pas responsables de la diminution de la production d'Hb dans les cellules K562.



**Figure 30 : Effet de la sphingomyélinase bactérienne de *S. aureus* sur la production d'hémoglobine dans les cellules CD34<sup>+</sup>**

Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo (E) ont été traitées avec différentes concentrations de sphingomyélinase bactérienne (bS) pendant 4 jours.

**A.** L'effet des traitements sur la différenciation érythroïde a été évalué par un test de coloration à la benzidine.

**B.** La viabilité des cellules a été évaluée par un test d'exclusion au bleu de Trypan.

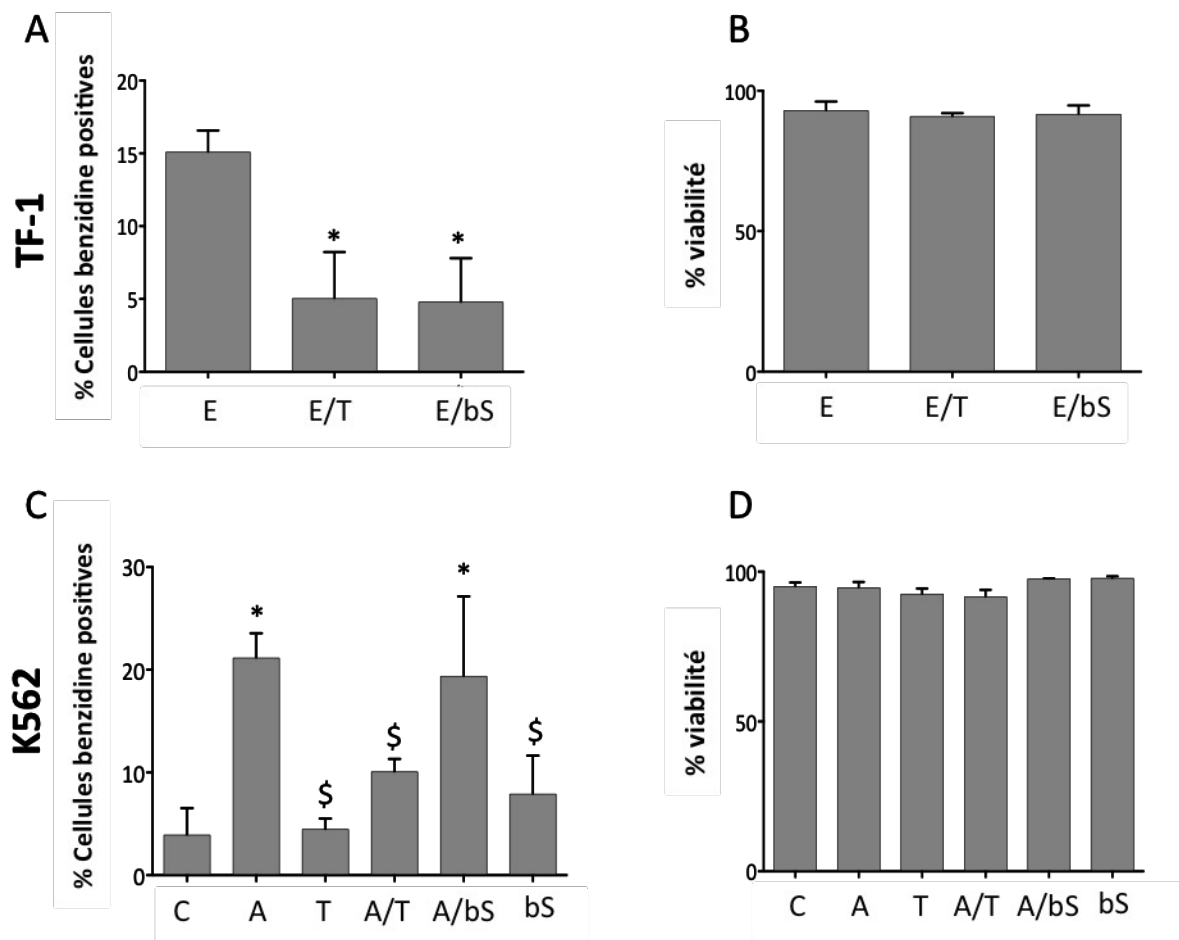
Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA en mesures répétées suivi du test de Dunnet (Graphpad Prism). (\* : p<0,05).

Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo (E) ont été traitées avec 0,5 U/mL de bS pendant 4 jours.

**C.** Les ARN totaux ont été extraits puis l'expression des globines α, β et γ et de l'EpoR a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène de l'actine β et calculés par la méthode du 2<sup>-ΔΔCT</sup>. Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et ont été analysées par un test de Student pour échantillons appariés (Graphpad Prism). (\* : p<0,05 ; \*\* : p<0,01).

**D.** L'expression des globines α, β et γ a été analysée par Western Blot à partir d'extraits cytoplasmiques de cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo (E) et traitées avec 0,5 U/mL de sphingomyélinase bactérienne (bS) pendant 4 jours. L'actine β est utilisée comme contrôle interne de dépôt des échantillons. L'expression relative correspond au rapport de l'intensité de la bande correspondant à la protéine étudiée sur celle de l'actine β, le contrôle étant normalisé à un. Les résultats montrent une expérience représentative parmi 3.





**Figure 31 : Effet de la sphingomyélinase bactérienne de *S. Aureus* sur la formation d'hémoglobine dans les cellules TF-1 et K562**

Les cellules TF-1 stimulées par l'Epo (E) et les cellules K562 induites par l'Acla (A) ont été traitées avec 0,5 U/mL de SMase bactérienne (bS) pendant 3 jours.

**A, C.** L'effet des traitements sur la différenciation érythroïde a été évalué par un test de coloration à la benzidine.

**B, D** La viabilité des cellules a été évaluée par un test d'exclusion au bleu de Trypan.

Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA en mesures répétées suivi du test de Dunnet (Graphpad Prism) (\*,\$ :  $p < 0,01$ ). Les \* correspondent à une différence significative par rapport au contrôle et les \$ par rapport au point Acla.

Nous avons montré que les céramides C2 à 30  $\mu\text{M}$  sont capables d'empêcher la formation d'Hb de la même manière que le  $\text{TNF}\alpha$  dans les CSPH  $\text{CD34}^+$ , les cellules TF-1 et les cellules K562. L'inhibition de l'expression des marqueurs érythroïdes spécifiques comme l'EpoR, la GPA et les globines confirme la capacité des C2 d'affecter la différenciation érythroïde. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les céramides générés par la SMase bactérienne à 0,5 U/mL inhibent la production d'Hb ainsi que l'expression des globines dans les CSPH et les cellules TF-1 induites par l'Epo alors qu'ils n'ont pas d'effet sur les cellules K562. En conclusion, les céramides ont le même effet que le  $\text{TNF}\alpha$  sur la différenciation érythroïde induite par l'Epo dans les CSPH  $\text{CD34}^+$  et TF-1. Ils sont donc potentiellement impliqués dans l'effet inhibiteur du  $\text{TNF}\alpha$  dans ces cellules (Figure 32).

#### 4.2.4 Conclusion

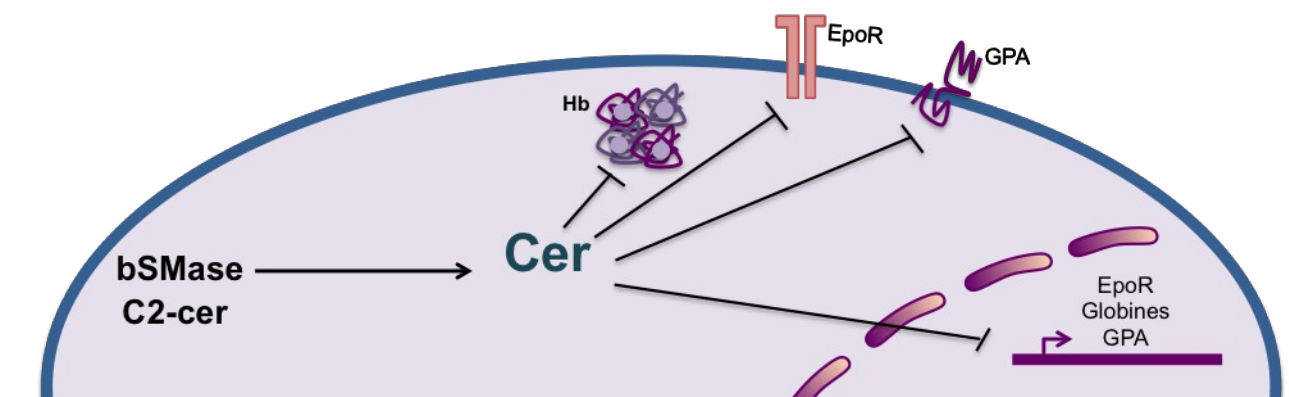


Figure 32 : Les céramides inhibent l'expression des marqueurs érythroïdes dans les cellules  $\text{CD34}^+$

### **4.3 Implication des sphingomyélinases dans l'inhibition de l'érythropoïèse**

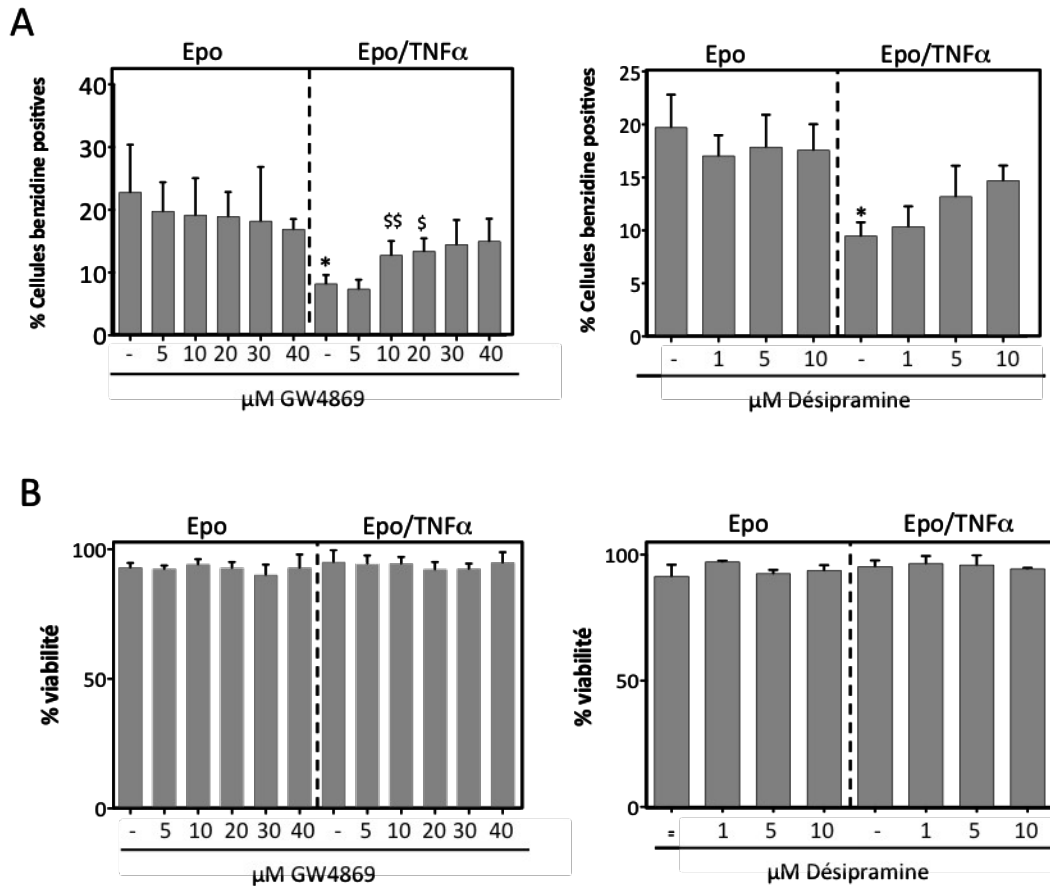
Dans le but de vérifier si le TNF $\alpha$  agit *via* la voie des SMases/céramides pour inhiber le développement érythroïde, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques de la nSMase : le GW4869 (GW) et de la aSMase : la désipramine (Des). Du point de vue expérimental, les cellules (CD34<sup>+</sup>, TF-1, K562) ont été traitées selon la séquence : 1h GW/Des → 1h TNF $\alpha$  → 1h Epo/Acla pendant 3 ou 4 jours.

#### **4.3.1 Dans les cellules CD34<sup>+</sup>**

Les cellules CD34<sup>+</sup> ont été traitées avec 5, 10, 20, 30 et 40  $\mu$ M de GW ou 1, 5 et 10  $\mu$ M de Des, puis avec 20 ng/mL de TNF $\alpha$  en présence de 2 U/mL d'Epo pendant 4 jours. Un test de coloration à la benzidine a été réalisé pour chaque inhibiteur (Figure 33A) et la viabilité des cellules a été évaluée par le test d'exclusion au bleu de Trypan (Figure 33B). Les résultats montrent que le GW à partir de 10  $\mu$ M est capable de restaurer partiellement l'hémoglobinisation des cellules CD34<sup>+</sup> inhibée par le TNF $\alpha$ , sans affecter la viabilité cellulaire alors que la Des n'a pas d'effet significatif. Le GW et la Des seuls n'ont pas d'effet sur la différenciation induite par l'Epo. Au-delà de 10  $\mu$ M, la Des présente un effet cytotoxique. Ces résultats sont confirmés par l'analyse par Western Blot et PCR en temps réel de l'expression des globines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  et de l'EpoR dans les cellules CD34<sup>+</sup> traitées avec 20  $\mu$ M de GW4869 pendant 4 jours mais pas dans les cellules traitées à la Des (Figure 34). Les concentrations de 20  $\mu$ M de GW et 10  $\mu$ M de Des seront utilisées pour la suite de l'étude.

#### **4.3.2 Dans les cellules TF-1**

Les cellules TF-1 ont été traitées pendant avec 20  $\mu$ M de GW ou 10  $\mu$ M de Des, puis traitées ou non par 20 ng/mL de TNF $\alpha$  en présence de 10 U/mL d'Epo pendant 3 jours. Un test de coloration à la benzidine a été réalisé et l'effet des différents traitements sur l'expression de la globine  $\gamma$  a été analysé par Western Blot (Figure 35A). La viabilité des cellules a été évaluée par le test d'exclusion au bleu de Trypan (Figure 35B). Les résultats montrent que le TNF $\alpha$  inhibe l'hémoglobinisation des cellules TF-1 et que le GW et la Des sont capables de restaurer partiellement le pourcentage de cellules positives à la benzidine, ainsi que l'expression de la globine  $\gamma$  sans affecter la viabilité cellulaire. Comme pour les CSPH CD34<sup>+</sup>, le GW et la Des seuls n'ont pas d'effet sur la différenciation induite par l'Epo.



**Figure 33 : Effet des inhibiteurs des sphingomyélinases neutre et acide (GW4869 et désipramine) sur l'activité inhibitrice du TNFα dans les cellules CD34<sup>+</sup>**

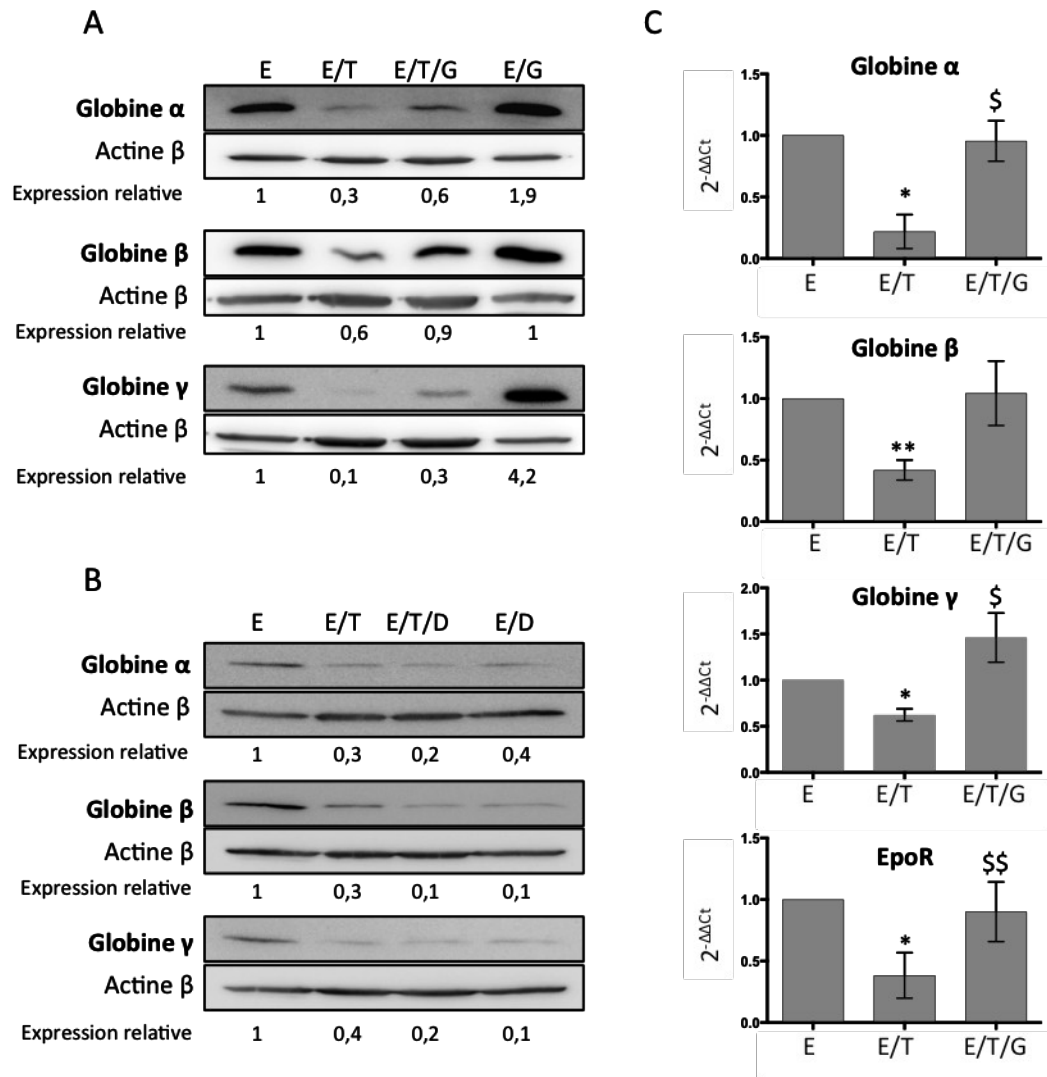
Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo ont été traitées par différentes concentrations d'un inhibiteur de la sphingomyélinase neutre, le GW4869, ou de la sphingomyélinase acide, la désipramine, en présence ou en absence de 20 ng/mL de TNFα pendant 4 jours.

**A.** L'effet des traitements sur la différenciation érythroïde a été évalué par un test de coloration à la benzidine.

**B.** La viabilité des cellules a été évaluée par un test d'exclusion au bleu de Trypan.

Les données représentent la moyenne de 4 ou 5 expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA 1 en mesures répétées suivi du test de Dunnet (Graphpad Prism). Les \* correspondent à une différence significative par rapport à l'Epo et les \$ par rapport au point Epo/TNFα.

(\*,\$ : p<0,05, \*\*,\$\$ : p<0,01).

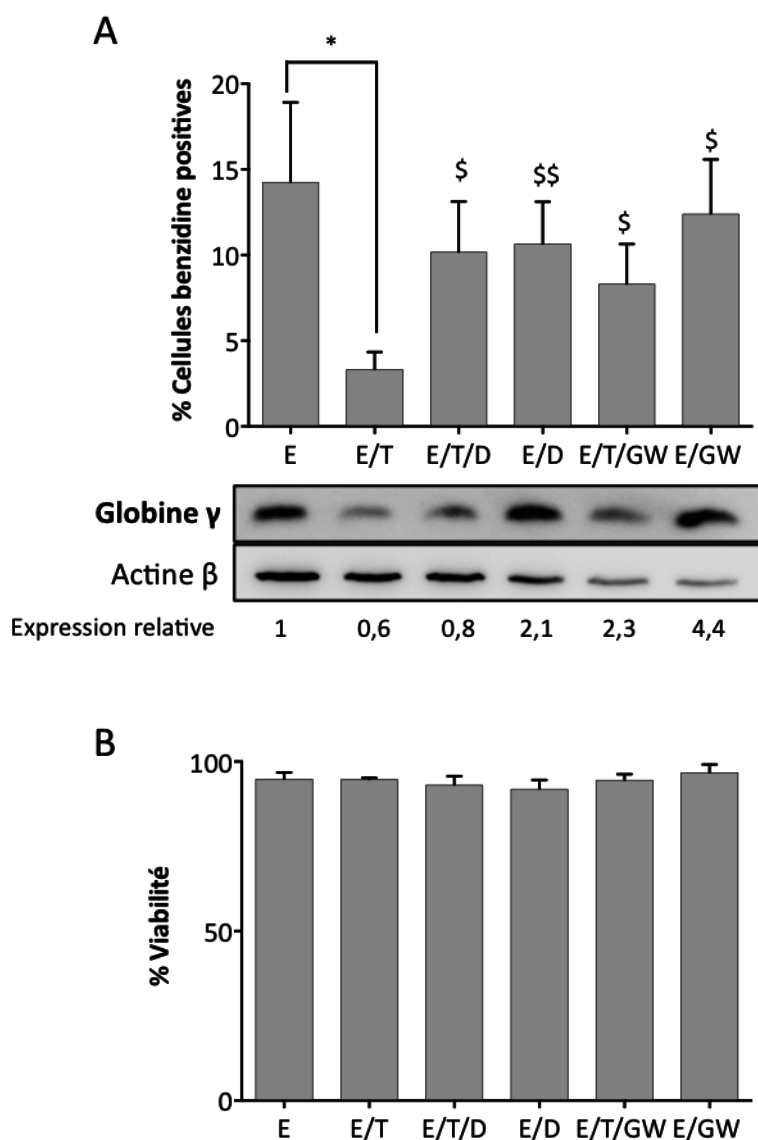


**Figure 34 : Effet des inhibiteurs des sphingomyélinases neutre et acide (GW4869 et désipramine) sur l'expression des globines dans les cellules CD34<sup>+</sup>**

Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par 2 U/mL d'Epo (E) ont été traitées par 20 ng/mL de TNFα (T) et 20 μM de GW4869 (G) (A) ou 10 μM de désipramine (D) (B) pendant 4 jours.

Les Western Blots ont été réalisés à partir d'extraits cytoplasmiques. L'actine β est utilisée comme contrôle interne de dépôt des échantillons. L'expression relative correspond au rapport de l'intensité de la bande correspondant à la protéine étudiée sur celle de l'actine β, le contrôle étant normalisé à 1. Les résultats montrent une expérience représentative parmi 3. C. Les ARN totaux ont été extraits puis l'expression des globines α, β et γ et de l'EpoR a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène de l'actine β et calculés par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA 1 en mesures répétées suivi du test de Dunnet (Graphpad Prism). Les \* correspondent à une différence significative par rapport à l'Epo et les \$ par rapport au point Epo/TNFα. (\*,\$ :  $p < 0,05$ , \*\*, \$\$ :  $p < 0,01$ ).



**Figure 35 : Effet des inhibiteurs des sphingomyélinases neutres et acides (GW4869 et désipramine) sur l'activité inhibitrice du TNF $\alpha$  dans les cellules TF-1.**

Les cellules TF-1 stimulées par l'Epo (E) ont été traitées par 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T) et 20  $\mu$ M de GW4869 (G) ou 10  $\mu$ M de désipramine (D) pendant 3 jours.

**A.** L'effet des traitements sur la différenciation érythroïde a été évalué par un test de coloration à la benzidine.

Le Western Blot a été réalisé à partir d'extraits cytoplasmiques. L'actine  $\beta$  est utilisée comme contrôle interne de dépôt des échantillons. L'expression relative correspond au rapport de l'intensité de la bande correspondant à la protéine étudiée sur celle de l'actine  $\beta$ , le contrôle étant normalisé à 1. Les résultats montrent une expérience représentative parmi 3.

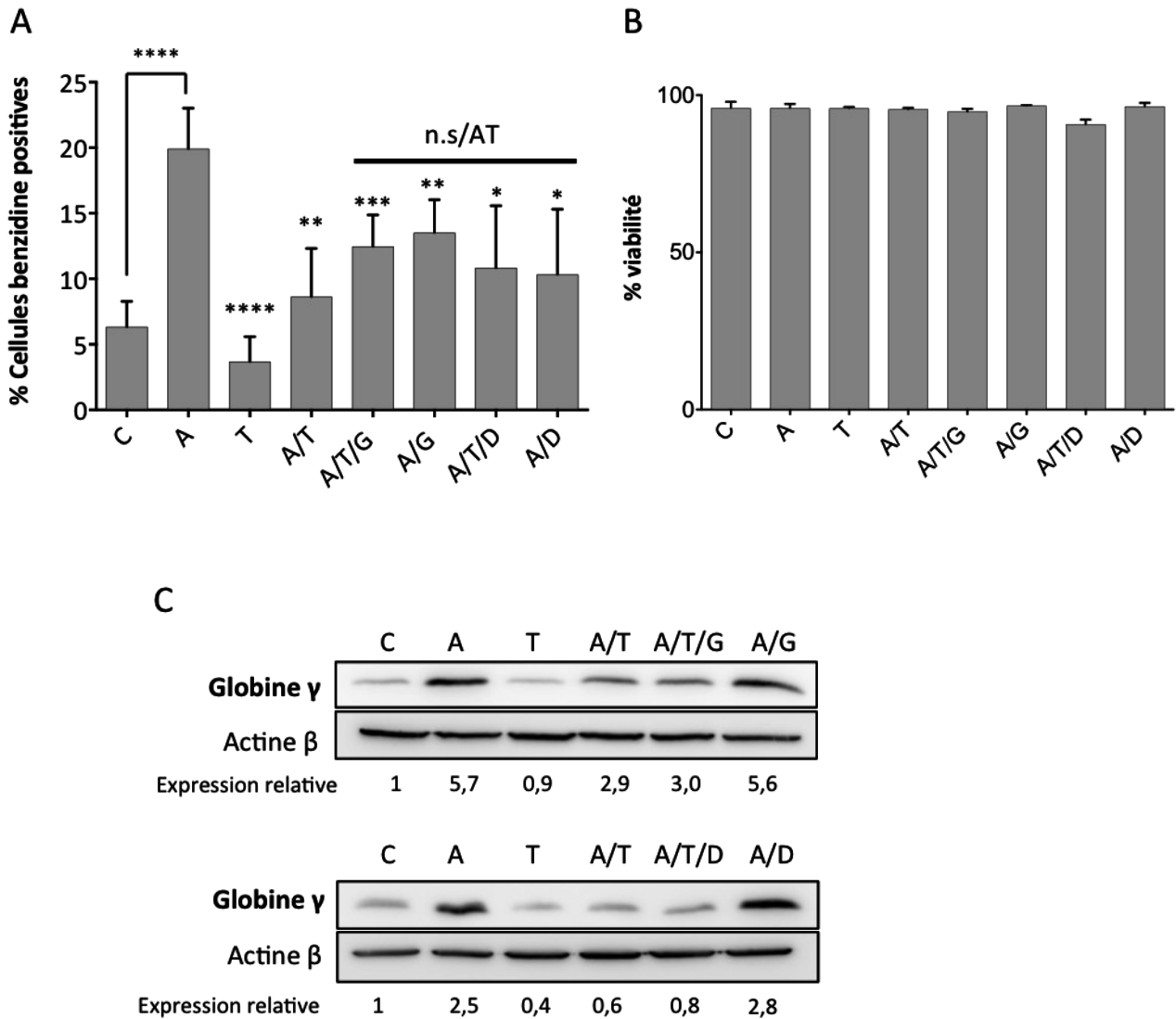
**B.** La viabilité des cellules a été évaluée par un test d'exclusion au bleu de Trypan.

Les données représentent la moyenne de 5 expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA 1 en mesures répétées suivi du test de Dunnet (Graphpad Prism).

Les \* correspondent à une différence significative par rapport à l'Epo et les \$ par rapport au point Epo/TNF $\alpha$ . (\*,\$ :  $p < 0,05$  ; \*\*,\$\$ :  $p < 0,01$ ).

### 4.3.3 Dans les cellules K562

Les cellules K562 ont été traitées avec 20  $\mu$ M de GW ou 10  $\mu$ M de Des, puis traitées ou non par 20 ng/mL de TNF $\alpha$  en présence de 10 nM d'Acla pendant 3 jours. Le nombre de cellules produisant de l'Hb a été évalué par un test de coloration à la benzidine et l'expression de la globine  $\gamma$  a été analysée par Western Blot (Figures 36A et 36C). La viabilité des cellules a été évaluée par un test d'exclusion au bleu de Trypan (Figures 36B). Les résultats montrent que le TNF $\alpha$  réduit le nombre de cellules positives à la benzidine ainsi que l'expression de la globine  $\gamma$ . Cependant, contrairement à l'effet observé dans les cellules CD34<sup>+</sup> et les TF-1, les inhibiteurs de SMases ne sont pas capables de restaurer le nombre de cellules positives à la benzidine et l'expression des globines, suggérant que l'inhibition de l'érythropoïèse par le TNF $\alpha$  est indépendante des sphingomyélinases dans les cellules K562, ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec la bSMase.



**Figure 36 : Effet de l'inhibiteur de la sphingomyélinase neutre GW4869 sur l'activité inhibitrice du TNF $\alpha$  dans les cellules K562.**

Les cellules K562 stimulées ou non (C) par l'Acla (A) ont été traitées par 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T) et 20  $\mu$ M de GW4869 (G) ou 10  $\mu$ M de désipramine (D) pendant 3 jours.

**A.** L'effet des traitements sur la différenciation érythroïde a été évalué par un test de coloration à la benzidine.

**B.** La viabilité des cellules a été évaluée par un test d'exclusion au bleu de Trypan.

Les données représentent à la moyenne de 8 expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA 1 en mesures répétées suivi du test de Dunnet (Graphpad Prism).

Les \* correspondent à une différence significative par rapport à l'Acla (\* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,01$ ; \*\*\* :  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ ; n.s/AT : non significatif par rapport à AT)

**C.** Les Western Blots ont été réalisés à partir d'extraits cytoplasmiques. L'actine  $\beta$  est utilisée comme contrôle interne de dépôt des échantillons. L'expression relative correspond au rapport de l'intensité de la bande correspondant à la protéine étudiée sur celle de l'actine  $\beta$ , le contrôle étant normalisé à 1. Les résultats montrent une expérience représentative parmi 3.



#### 4.3.4. Conclusion

L'inhibition des SMases a permis de montrer l'implication de ces deux enzymes connues pour être activées par le TNF $\alpha$ , dans l'inhibition de la formation d'Hb par le TNF $\alpha$ . Cependant, les deux types de SMase semblent jouer un rôle dans les cellules TF-1 alors que seule la nSMase est impliquée dans l'inhibition de l'érythropoïèse dans les CSPH CD34<sup>+</sup> (Figure 37). En revanche, les résultats confirment que la voie TNF $\alpha$ /SMase/céramide n'est pas impliquée dans l'inhibition de la différenciation des cellules K562.

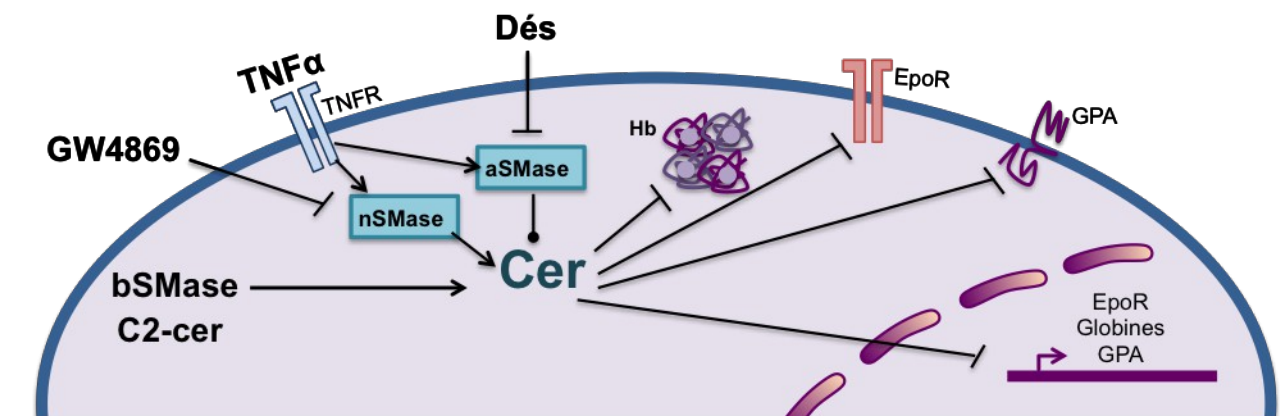
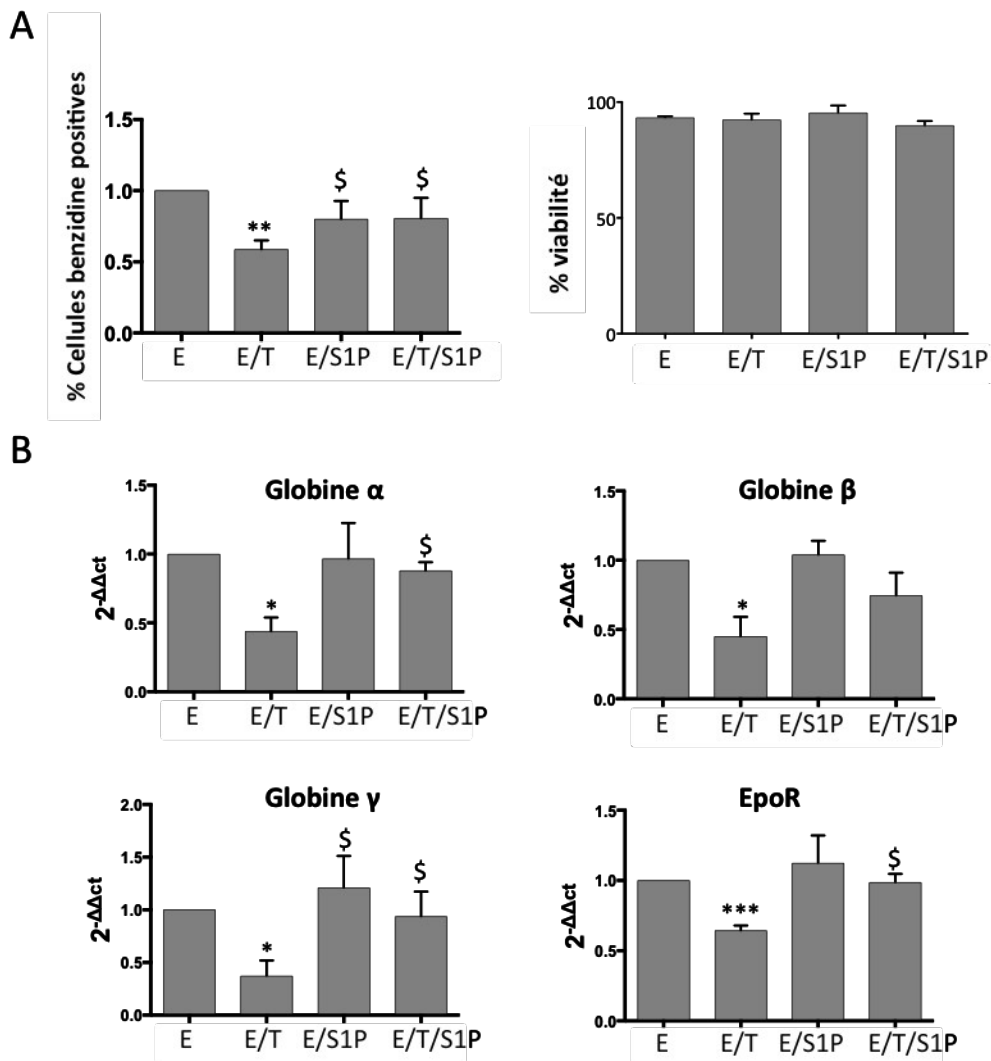


Figure 37 : Le TNF $\alpha$  inhibe l'érythropoïèse *via* la voie nSMase/Céramide dans les cellules CD34<sup>+</sup>

#### 4.4 Effet de la sphingosine-1-phosphate sur l'érythropoïèse

D'autre part, nous nous sommes intéressés à la sphingosine-1-phosphate (S1P), un sphingolipide bioactif qui joue également un rôle dans l'inflammation. La S1P est un métabolite des céramides généré par une première réaction de clivage de l'acide gras par la céramidase pour donner la sphingosine qui est à son tour phosphorylée grâce à la sphingosine kinase (SphK). La S1P présente des effets cellulaires opposés à ceux des céramides et forme ainsi un équilibre céramide/S1P appelé rhéostat des sphingolipides qui détermine le devenir cellulaire. Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées à l'Epo ont été traitées avec 20 ng/mL de TNF $\alpha$ , 5  $\mu$ M de S1P ou en co-traitement TNF $\alpha$ /S1P pendant 4 jours. L'effet de la S1P sur la différenciation a pu être évalué par un test de coloration à la benzidine (Figure 38A) et par l'analyse de l'expression des globines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  ainsi que de l'EpoR par PCR en temps réel (Figure 38B). Les résultats obtenus montrent que la S1P n'a pas d'effet inhibiteur sur le nombre de cellules positives à la benzidine induit par l'Epo. Au contraire, dans les cellules traitées au TNF $\alpha$ , la S1P est même capable de restaurer le nombre de cellules positives à la benzidine ainsi que l'expression des globines et de l'EpoR. Ces résultats montrent que la S1P n'est pas impliquée dans l'inhibition de l'érythropoïèse par le TNF $\alpha$ . De plus, nous nous sommes intéressés à l'effet du TNF $\alpha$  sur l'expression de la SphK1 dans les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo. Après 24h de traitement l'expression de l'ARNm et de la protéine SphK1 a été analysée par PCR en temps réel et Western Blot (Figure 39A). Les résultats obtenus montrent que le TNF $\alpha$  diminue l'expression de la sphingosine kinase suggérant une perturbation du rhéostat avec une accumulation de céramides et de sphingosine. Nous avons confirmé ces résultats grâce à l'utilisation d'un inhibiteur de la SphK1, le PF-543. L'effet du PF-543 sur l'érythropoïèse a été évalué par un test de coloration à la benzidine (Figure 39B). Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo ont donc été traitées avec du TNF $\alpha$ , du PF-543 ou en cotraitement TNF $\alpha$ /PF-543 pendant 4 jours. Les résultats obtenus montrent que le PF-543 seul est capable de diminuer le nombre de cellules positives à la benzidine d'environ 70% de manière similaire au TNF $\alpha$ . En cotraitement avec le TNF $\alpha$ , l'effet augmente avec plus de 90% d'inhibition. Ensemble, ces résultats suggèrent que le TNF $\alpha$  inhibe la formation de S1P *via* l'inhibition de la SphK1 et induit l'accumulation de céramides en accord avec l'inhibition de l'érythropoïèse.



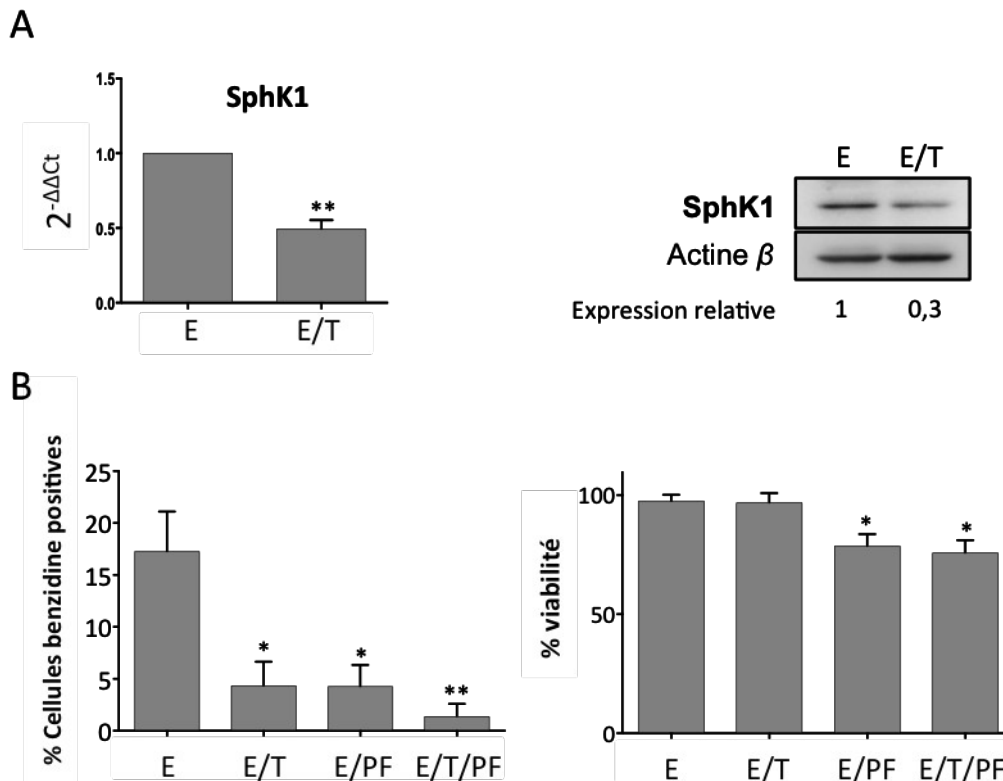
**Figure 38 : Effet de la sphingosine-1-phosphate sur la production d'hémoglobine**

Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo (E) ont été traitées avec du TNF $\alpha$  (T) et 5  $\mu$ M de sphingosine-1-phosphate (S1P) pendant 4 jours.

**A.** L'effet des traitements sur la différenciation érythroïde a été évalué par un test de coloration à la benzidine et la viabilité des cellules a été évaluée par un test d'exclusion au bleu de Trypan.

Les données représentent la moyenne de 4 expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA 1 en mesures répétées suivi du test de Dunnet (Graphpad Prism).

**B.** Les ARN totaux ont été extraits puis l'expression des globines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  et de l'EpoR a été analysé par PCR en temps réel. Les résultats de la PCR en temps réel ont été normalisés par rapport au gène de l'actine  $\beta$  et calculés par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA 1 pour les échantillons appariés suivi du test de Dunnet (Graphpad Prism). (\*,\$ :  $p < 0,05$ , \*\*,\$\$ :  $p < 0,01$ ). Les \* correspondent à une différence significative par rapport à l'Epo et les \$ par rapport au point Epo/TNF $\alpha$ .



**Figure 39 : Effet du TNF $\alpha$  sur l'expression de la sphingosine kinase**

**A.** Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo (E) ont été traitées avec du TNF $\alpha$  (T) pendant 24h. Les ARN totaux et les protéines totales ont été extraits puis l'expression de la sphingosine kinase 1 (SphK1) a été analysée par PCR en temps réel et Western blot. Les résultats de la PCR en temps réel ont été normalisés par rapport au gène de l'actine  $\beta$  et calculés par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et ont été analysées par un test de Student pour échantillons appariés (Graphpad Prism) (\*\* :  $p < 0,01$ ). Le Western Blot a été réalisé à partir d'extraits totaux. L'actine  $\beta$  est utilisée comme contrôle interne de dépôt des échantillons. L'expression relative correspond au rapport de l'intensité de la bande correspondant à la protéine étudiée sur celle de l'actine  $\beta$ , le contrôle étant normalisé à 1. Les résultats montrent une expérience représentative parmi 3.

**B.** Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo (E) ont été traitées avec du TNF $\alpha$  (T) et 5  $\mu$ M de l'inhibiteur de la SphK1, le PF-543 (PF). L'effet des traitements sur la différenciation érythroïde a été évalué par un test de coloration à la benzidine et la viabilité des cellules a été évaluée par un test d'exclusion au bleu de Trypan.

Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA 1 en mesures répétées suivi du test de Dunnet (Graphpad Prism). (\* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ ).

#### 4.4.1 Conclusion

La S1P n'est pas impliquée dans l'inhibition de l'érythropoïèse mais joue au contraire un rôle plutôt positif. En effet la S1P prévient l'effet du  $TNF\alpha$  alors que le blocage de sa production en inhibant la sphingosine kinase (SphK) renforce l'effet du  $TNF\alpha$ . De plus, l'inhibiteur de SphK1 présente le même effet que le  $TNF\alpha$  sur l'érythropoïèse dans les CSPH CD34<sup>+</sup>. L'inhibition observée de l'expression de la SphK1 par le  $TNF\alpha$  est donc en accord avec le rôle positif de la S1P sur l'érythropoïèse, faisant ainsi des céramides les principaux inhibiteurs (Figure 40).

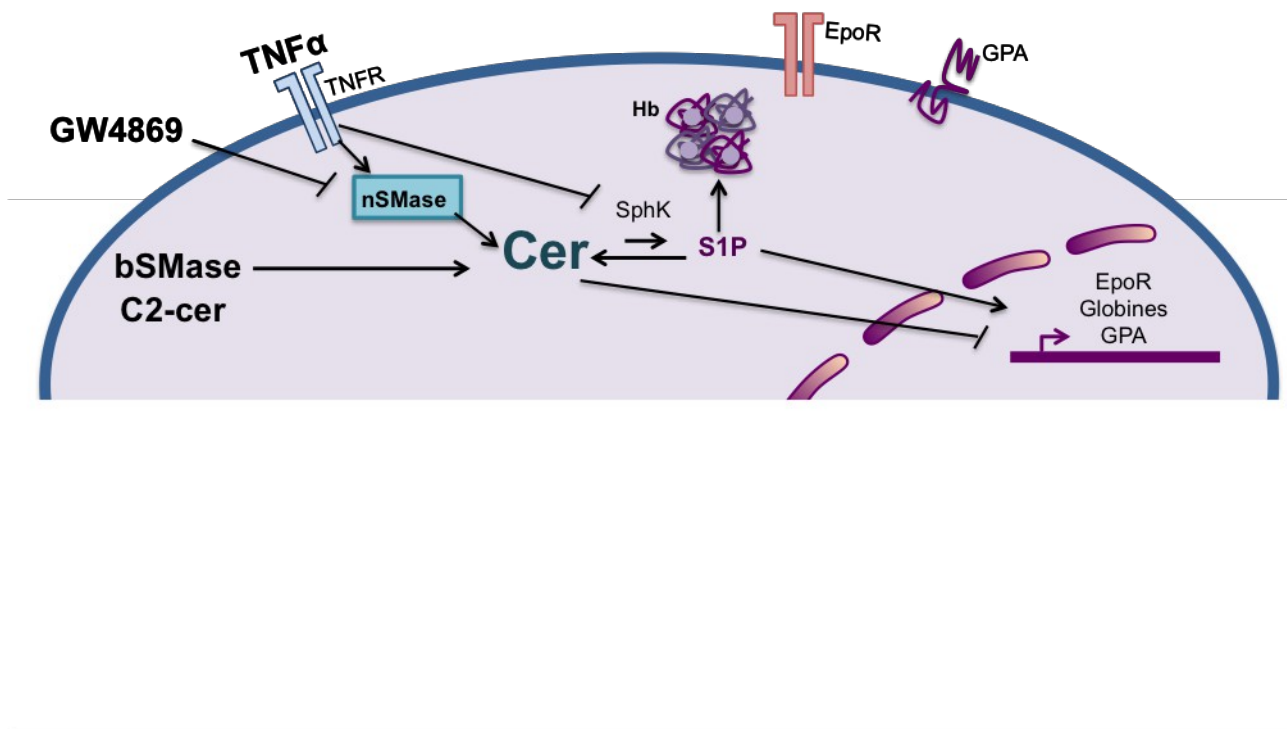


Figure 40 : Le  $TNF\alpha$  inhibe l'expression de la sphingosine kinase

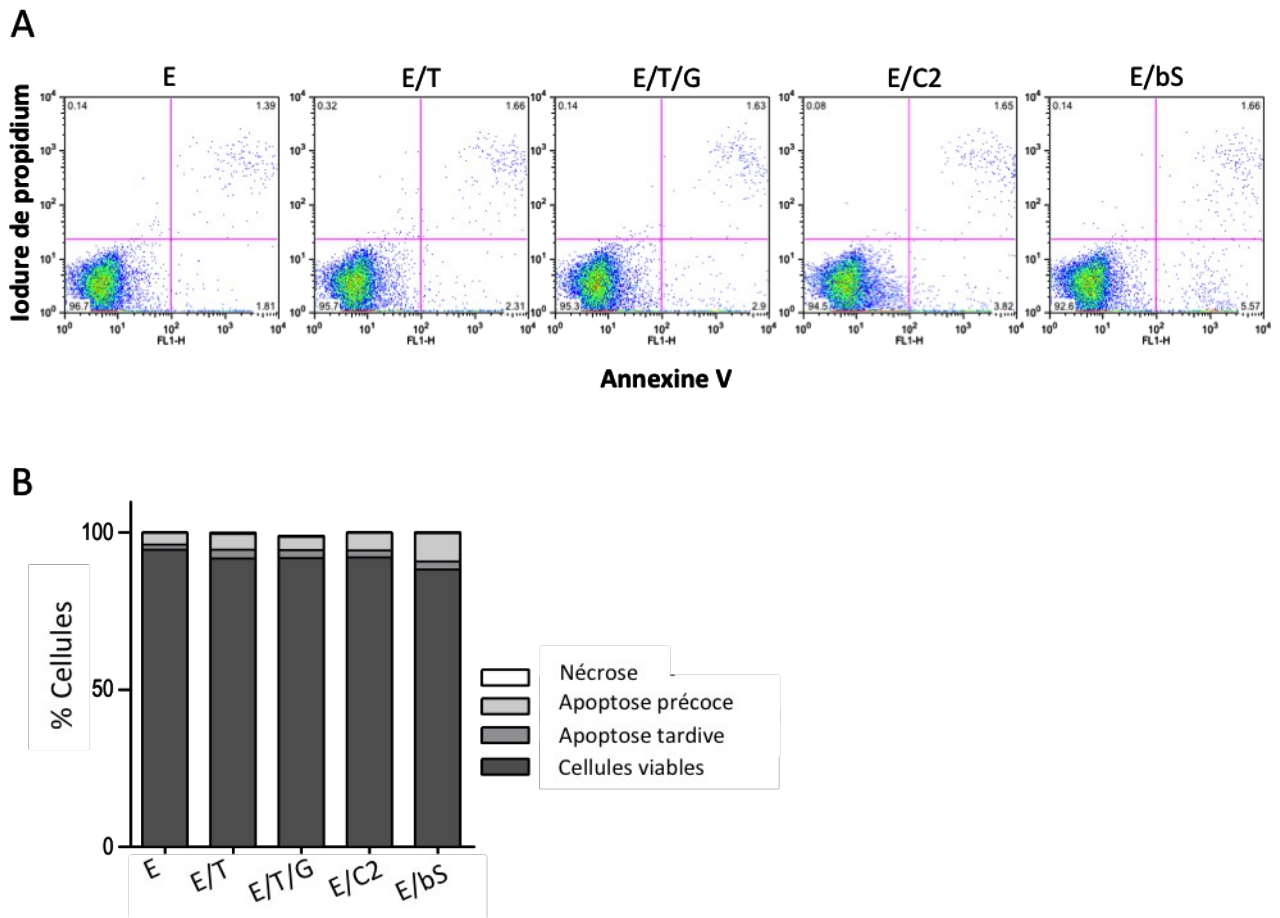
## **4.5 Effet du TNF $\alpha$ et des céramides sur la différenciation hématopoïétique**

### **4.5.1 Effet des céramides et des inhibiteurs de sphingomyélinase sur la viabilité cellulaire**

Les résultats ont montré que le TNF $\alpha$  et les céramides inhibent l'érythropoïèse induite par l'Epo. Cette inhibition n'est pas liée à un effet cytostatique ni cytotoxique comme l'ont démontré les tests d'exclusion au bleu de Trypan. Nous avons donc étudié la nature des cellules viables non différenciées vers la voie érythroïde en présence d'Epo et de TNF $\alpha$  ou de céramide. Dans un premier temps nous avons confirmé que les différents traitements n'affectent pas la viabilité cellulaire aux concentrations utilisées. Les cellules CD34<sup>+</sup> ont donc été traitées pendant 4 jours avec de l'Epo (2 U/mL), 20 ng/mL de TNF $\alpha$ , 20  $\mu$ M de GW, 30  $\mu$ M de C2-cer ou 0,5 U/mL de bSMase puis marquées à l'Annexine V/iodure de propidium et analysées par cytométrie de flux (Figure 41). Comme attendu, les résultats montrent que les différents traitements n'affectent pas la viabilité cellulaire.

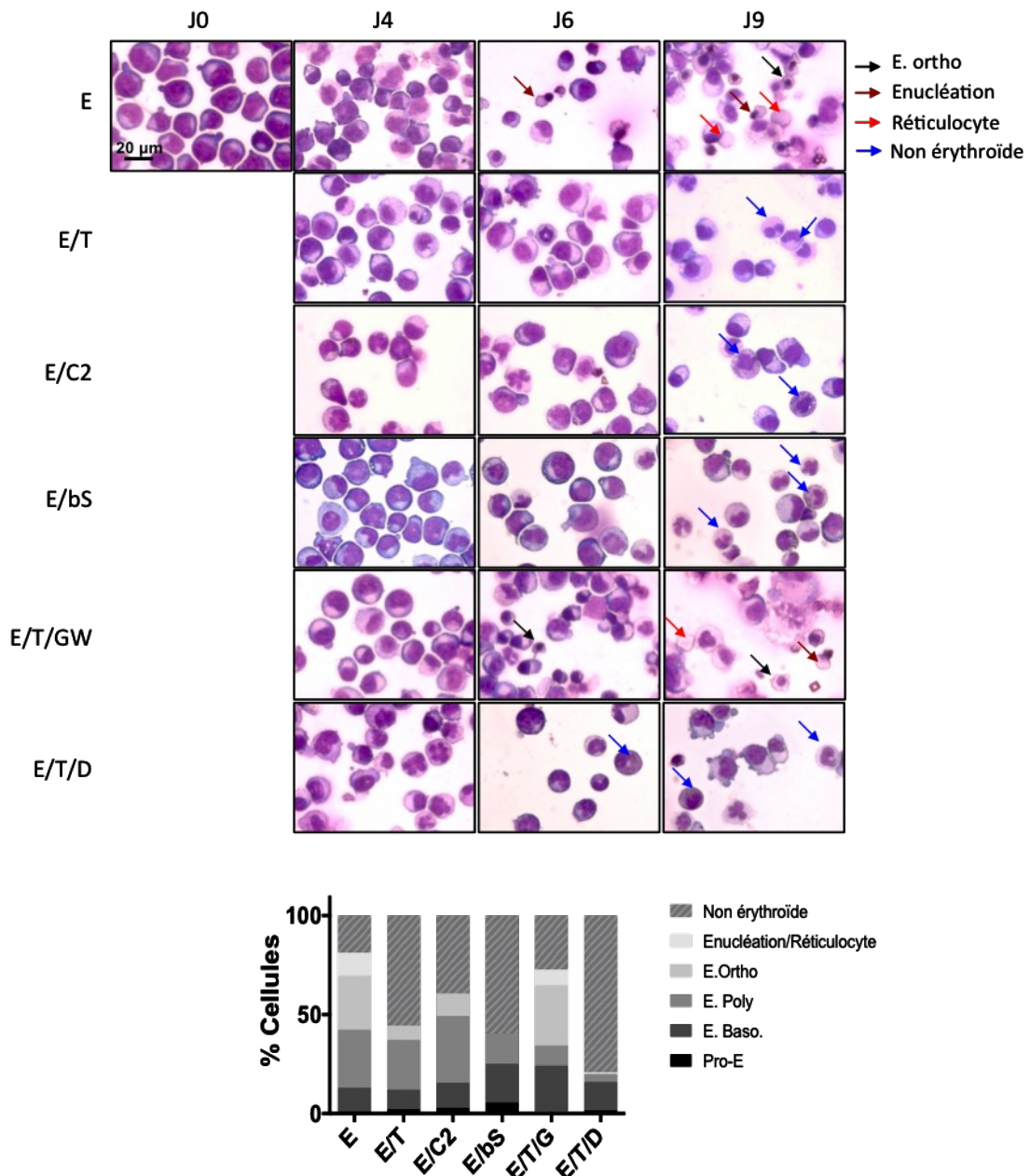
### **4.5.2 Impact du TNF $\alpha$ , des céramides et des inhibiteurs de sphingomyélinases sur la morphologie cellulaire**

Dans le but d'étudier l'effet de la voie TNF $\alpha$ /SMase/céramide sur le déroulement de l'érythropoïèse et d'évaluer le destin des cellules non différenciées vers la voie érythroïde, la morphologie cellulaire des CSPH CD34<sup>+</sup> a été observée par coloration MGG au jour 0 (avant l'ajout d'Epo), et après 4, 6 et 9 jours de traitement à l'Epo (2 U/mL), au TNF $\alpha$  (20 ng/mL), aux C2-cer (30  $\mu$ M), à la bSMase (0,5 U/mL), au GW (20  $\mu$ M) ou à la Des (10  $\mu$ M) (Figure 42). Notre modèle de différenciation érythroïde permet de reproduire l'érythropoïèse *ex vivo*. En effet, la stimulation des CSPH CD34<sup>+</sup> par l'Epo induit la formation d'érythroblastes basophiles et polychromatophiles dès 4 jours de traitement. Au jour 6, des érythroblastes orthochromatophiles apparaissent et quelques énucléations peuvent être observées. Les stades de différenciation les plus tardifs (érythroblastes orthochromatophiles, énucléations et réticulocytes) sont observés en nombre après 9 jours de traitement. Cependant, quelques cellules engagées dans d'autres voies de différenciation comme des précurseurs des voies granulocytaire et monocytaire ont pu être observées. En présence de TNF $\alpha$ , des érythroblastes basophiles et polychromatophiles sont visibles après 4 jours. En revanche, après 6 et 9 jours de traitement, aucune cellule érythroïde mature ne peut être observée et les cellules présentes correspondent à des cellules engagées vers les voies granulocytaires et monocytaires. Dans les cellules traitées avec les C2-cer et la bSMase, comme dans les cellules traitées au TNF $\alpha$ , la différenciation érythroïde reste inachevée alors que l'on peut également observer la présence d'un grand nombre de cellules engagées dans la voie granulo-monocytaire.



**Figure 41 : Effet des différents traitements sur la viabilité cellulaire**

Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par 2 U/mL d'Epo (E) ont été traitées avec 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T), 30  $\mu$ M de céramides C2 (C2), 0,5 U/mL de sphingomyélinase bactérienne (bS) ou en cotraitement TNF $\alpha$ /GW4869 (G) 20  $\mu$ M pendant 4 jours. L'effet des différents traitements sur la viabilité cellulaire est évalué par cytométrie de flux après un marquage à l'Annexine V et à l'iodure de propidium. Les résultats ont été analysés avec le logiciel FlowJo. **A.** Les graphiques montrent une expérience représentative parmi 3. **B.** Représentation de la distribution des différentes populations cellulaires.



**Figure 42 : Effet des céramides et des inhibiteurs de sphingomyélinases sur l'évolution morphologique des cellules CD34<sup>+</sup>**

Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par 2 U/mL d'Epo (E) ont été traitées avec 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T), 30  $\mu$ M de céramides C2 (C2), 0,5 U/mL de sphingomyélinase bactérienne (bS) ou en cotraitement TNF $\alpha$ /GW4869 (GW) 20  $\mu$ M ou TNF $\alpha$ /désipramine (D) 10  $\mu$ M, pendant 4, 6 et 9 jours. L'effet des différents traitements sur la morphologie cellulaire est évalué par une coloration MGG aux jours 0, 4, 6 et 9. Les flèches noires correspondent aux érythroblastes orthochromatophiles (E. ortho), les flèches marron, aux cellules en cours d'enucléation et les rouges aux réticulocytes. Les flèches bleues représentent les cellules non érythroïdes qui sont des progéniteurs et cellules matures de la voie granulo-monocytaire. Les photos ont été prises au microscope optique, objectif 40X. Les résultats montrent une expérience représentative parmi 3. La quantification des cellules au jour 9 est représentée sous forme d'histogramme sous les photos.



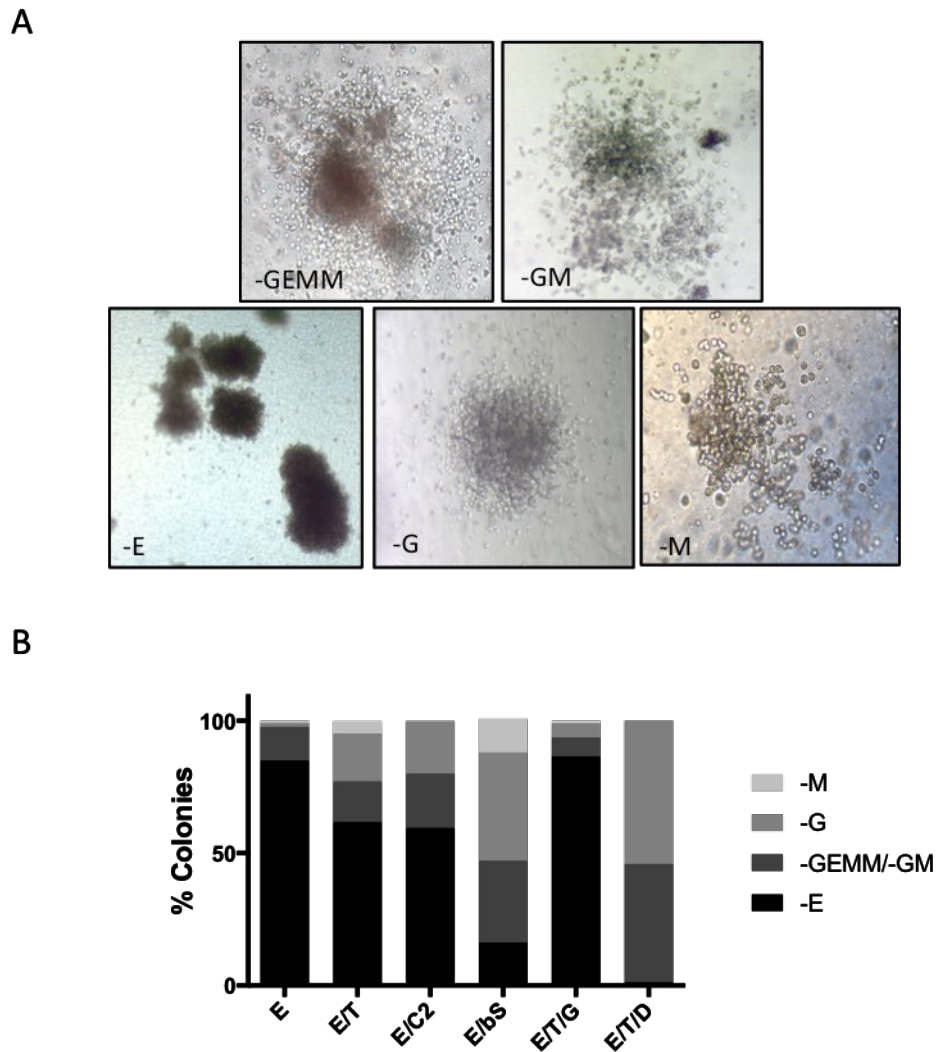
De plus, les résultats obtenus montrent que l'inhibiteur de la nSMase, le GW4869, est capable de prévenir l'effet inhibiteur du TNF $\alpha$  sur l'érythropoïèse. En effet, il permet la formation d'érythroblastes orthochomatophiles et de réticulocytes aux jours 6 et 9. En revanche, l'inhibiteur de la aSMase, la Des, n'est pas capable de bloquer l'effet du TNF $\alpha$ . Ces résultats confirment ceux obtenus par l'analyse des marqueurs érythroïdes et suggèrent qu'au-delà de leur effet inhibiteur de l'érythropoïèse, le TNF $\alpha$  et les céramides favorisent la différenciation granulo-monocytaire dans notre modèle.

#### **4.5.3 Caractérisation des populations induites par le TNF $\alpha$ et les céramides dans les CSPH CD34<sup>+</sup>**

Les cellules sont donc engagées dans une voie de différenciation différente de la voie érythroïde, et les résultats précédents suggèrent que le TNF $\alpha$  et les céramides favorisent la différenciation granulo-monocytaire. Nous nous sommes donc intéressés à la capacité du TNF $\alpha$  et des céramides à former des cellules engagées vers la voie granulo-monocytaire malgré la présence de l'Epo en réalisant un test clonogénique. Les cellules CD34<sup>+</sup> ont été reprises dans du milieu semi-solide, stimulées par l'Epo puis traitées avec 20 ng/mL de TNF $\alpha$ , 30  $\mu$ M de C2-cer, 0,5 U/mL de bSMase ou en cotraitement TNF $\alpha$ /GW4869 (20  $\mu$ M) ou TNF $\alpha$ /Des (10  $\mu$ M) pendant 14 jours afin d'identifier les types de colonies cellulaires ou « colony forming units » (CFU)/ « burst forming units (BFU). Les CFU-granulocyte-érythrocyte-macrophage-mégacaryocyte/granulocyte-monocyte (GEMM/GM), les BFU/CFU-érythroïdes (E), CFU-granulocyte (G) et -monocyte (M) ont été observées au microscope optique, identifiées (Figure 43A) et comptées (Figure 43B). Les résultats montrent que l'Epo induit majoritairement la formation de CFU/BFU-E (80%). Le TNF $\alpha$ , les C2-cer et la bSMase diminuent le nombre de CFU/BFU-E d'environ 20% pour le TNF $\alpha$  et les C2-cer et de 60% pour la bSMase au profit de la formation de colonies CFU-G et M. De plus, l'inhibiteur de la nSMase, le GW4869 est capable de restaurer le nombre de CFU/BFU-E par rapport aux cellules co-traitées Epo/TNF $\alpha$  en accord avec les résultats observés précédemment. L'inhibiteur de la aSMase, la désipramine, induit majoritairement la formation de CFU-G.

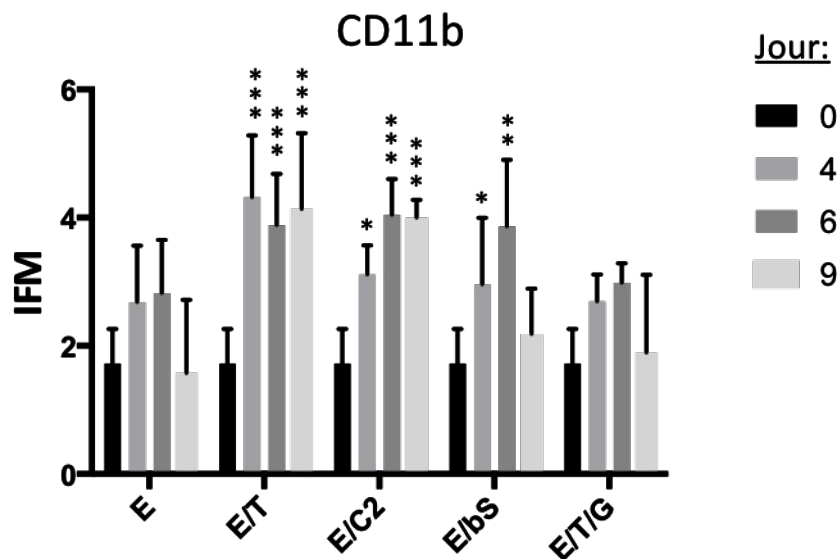
#### **4.5.4 Effet du TNF $\alpha$ sur l'expression du marqueur de différenciation granulo-monocytaire CD11b**

Dans le but de confirmer la capacité du TNF $\alpha$  d'induire la différenciation des CSPH CD34<sup>+</sup> vers la voie granulo-monocytaire, nous avons étudié l'effet du TNF $\alpha$  (20 ng/mL), des C2-cer (30  $\mu$ M), de la bSMase (0,5 U/mL) et du GW4869 (20  $\mu$ M) sur l'expression du marqueur de différenciation granulo-monocytaire CD11b (Figure 44) par cytométrie de flux aux jours 0, 4, 6 et 9. Les résultats



**Figure 43 : Effet du  $TNF\alpha$  et des céramides sur la formation de colonies hématopoïétiques en présence d'Epo**

Les cellules  $CD34^+$  stimulées par 2 U/mL d'Epo (E) ont été traitées avec 20 ng/mL de  $TNF\alpha$  (T), 30  $\mu$ M de céramides C2 (C2), 0,5 U/mL de sphingomyélinase bactérienne (bS) ou en cotraitement  $TNF\alpha$ /GW4869 (GW) 20  $\mu$ M ou  $TNF\alpha$ /désipramine (D) 10  $\mu$ M pendant 14 jours. L'effet des différents traitements sur la formation de colonies est évalué par un test clonogénique. **A.** Photographies représentatives des différents types de colonies, prises au microscope optique, objectif 10X. **B.** Distribution des colonies en fonctions des différents traitements au jour 14.



**Figure 44 : Effet du TNF $\alpha$  sur l'expression du marqueur CD11b dans les cellules CD34<sup>+</sup>**

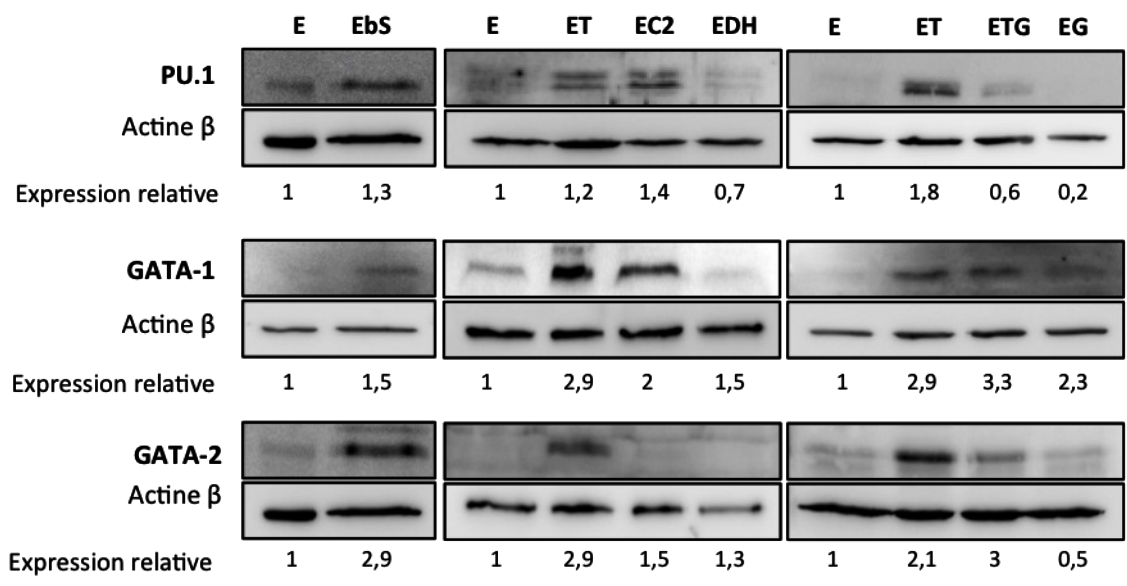
Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo (E) (2 U/mL) ont été traitées avec du TNF $\alpha$  (T) (20 ng/mL), des C2-cer (C2) (30  $\mu$ M), de la bSMase (bS) (0,5 U/mL) et du GW4869 (GW) (20  $\mu$ M) pendant 4, 6 et 9 jours. L'expression du marqueur granulo-monocytaire CD11b a été analysée par cytométrie de flux aux jours 0, 4, 6 et 9. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel FlowJo. L'histogramme correspond à l'intensité de fluorescence moyenne (IFM) en fonction de la durée du traitement. Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA 2 suivi du test de Holm-Sidak (Graphpad Prism) (\* : p<0,05 ; \*\* : p<0,01; \*\*\* : p<0,001).

obtenus montrent que le TNF $\alpha$  et les C2-cer augmentent significativement de deux fois l'expression du marqueur CD11b en accord avec les résultats obtenus précédemment. Ceci confirme la capacité de la voie TNF $\alpha$ /céramide de favoriser la différenciation myéloïde des CSPH CD34<sup>+</sup> en présence d'Epo.

## **4.6 Effet du TNF $\alpha$ et des céramides sur des facteurs de régulation communs aux voies érythroïde et myéloïde**

### **4.6.1 Les facteurs de transcription**

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet du TNF $\alpha$  et des céramides sur certains facteurs de transcription et miR qui jouent un rôle central dans le réseau de régulation de l'hématopoïèse. Le facteur GATA-1 intervient dans l'érythropoïèse et permet la transcription des gènes érythroïdes spécifiques (globines, EpoR, GPA,...), le facteur GATA-2 est un inhibiteur de l'érythropoïèse et le facteur de transcription PU.1 est un inhibiteur de GATA-1 et intervient dans le développement granulo-monocytaire et lymphoïde B (Klemsz *et al.*, 1990, Zon *et al.*, 1991, Zhang *et al.*, 2000, Fiedler *et al.*, 2012). Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées à l'Epo ont donc été traitées avec 20 ng/mL de TNF $\alpha$ , 30  $\mu$ M de C2-cer, 30  $\mu$ M de DH, 0,5 U/mL de bSMase et 20  $\mu$ M de GW4869 pendant 4 jours et l'expression des facteurs GATA-1, GATA-2 et PU.1 a été analysée par Western Blot (Figure 45). Les résultats montrent que l'expression du facteur GATA-1 est augmentée après 4 jours de traitement au TNF $\alpha$ , aux C2-cer ou à la bSMase mais n'est pas modifiée par le DH. Les céramides pourraient donc être impliquées dans l'augmentation de son expression. Cependant, le GW4869 n'est pas capable de prévenir l'effet du TNF $\alpha$  suggérant que l'augmentation de GATA-1 est due également à d'autres voies induites par le TNF $\alpha$ . Nous pouvons également observer une augmentation de l'expression du facteur PU.1, inhibiteur de l'activité de GATA-1, en accord avec l'inhibition de l'érythropoïèse. En effet, les résultats montrent qu'après 4 jours de traitement, l'expression de PU.1 est également augmentée dans les cellules traitées au TNF $\alpha$ , aux C2-cer et à la bSMase. Le GW4869 est capable de ramener PU.1 à un niveau d'expression bas, comparable à l'Epo. De la même manière, les résultats montrent que le GW4869 prévient l'augmentation de l'expression du facteur GATA-2 dans les cellules traitées au TNF $\alpha$  et que la bSMase est capable d'induire son expression. Cependant, les C2-cer n'ont pas d'effet. Ensemble, ces résultats sont en accord avec l'effet inhibiteur du TNF $\alpha$  et des céramides sur l'érythropoïèse et de la potentialité à induire la différenciation myéloïde.

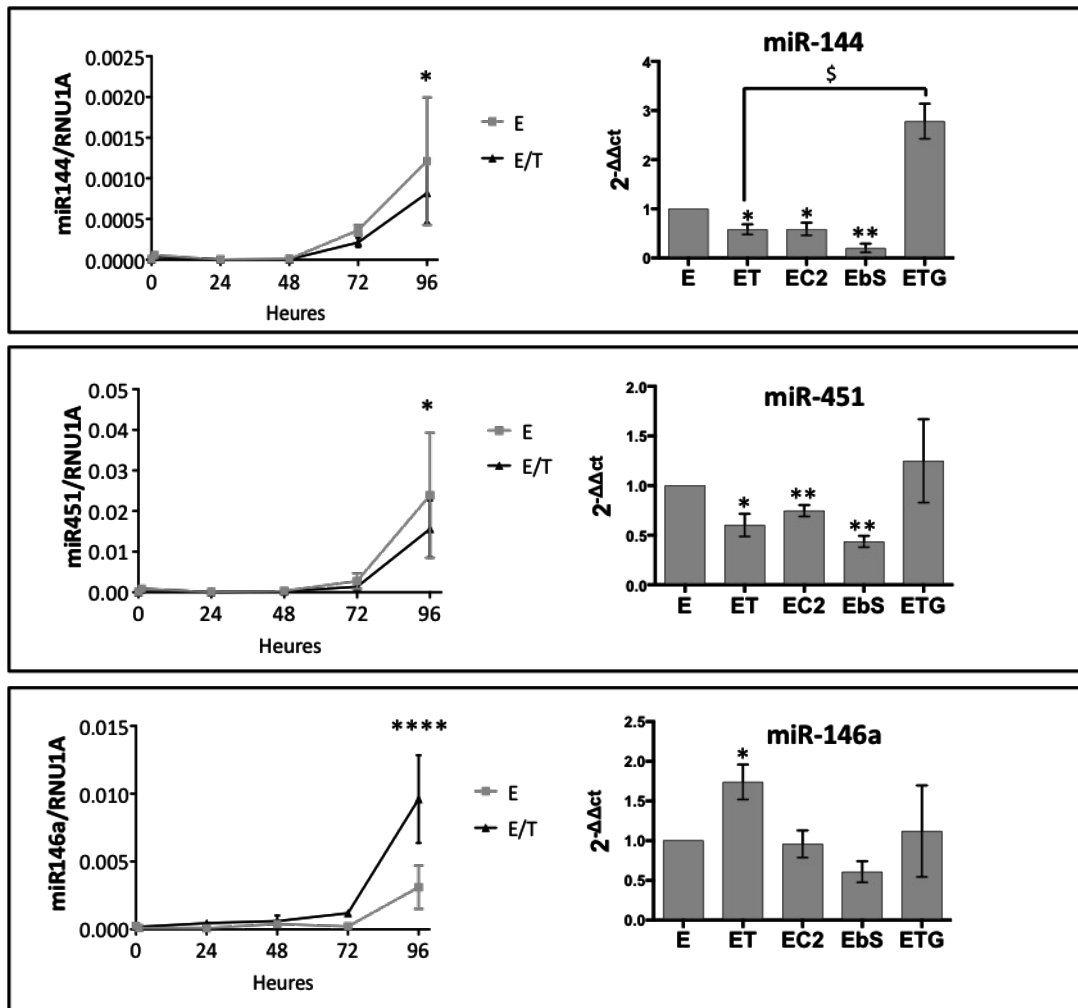


**Figure 45 : Effet des céramides sur l'expression des facteurs de transcription hématopoïétiques GATA-1, GATA-2 et PU.1**

Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par 2 U/mL d'Epo (E) ont été traitées par 20 ng/mL de TNF $\alpha$ , 0,5 U/mL de bSMase (bS), 30  $\mu$ M de C2-cer (C2) ou de dihydrocéramides C2 (DH) et 20  $\mu$ M de GW4869 (G) pendant 4 jours. Les Western Blots ont été réalisés à partir d'extraits nucléaires. L'actine  $\beta$  est utilisée comme contrôle interne de dépôt des échantillons. L'expression relative représente le rapport de l'intensité de la bande correspondant à la protéine étudiée sur celle de l'actine  $\beta$ , le contrôle étant normalisé à 1. Les résultats montrent une expérience représentative parmi 3.

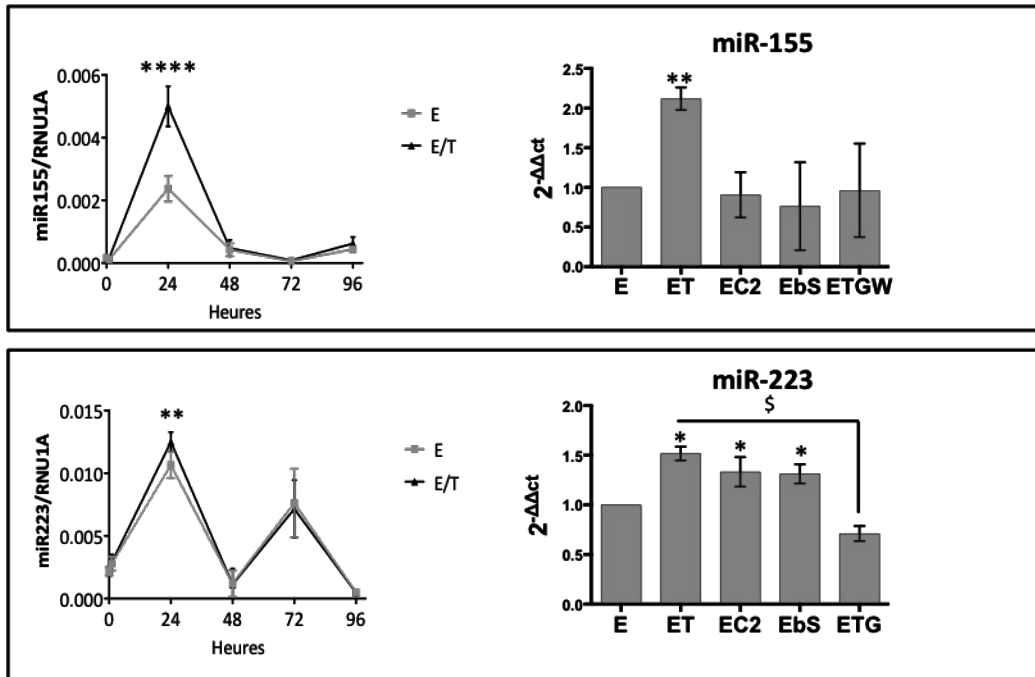
#### 4.6.2 Les microARN

Une série de miR ont également été décrits comme des acteurs importants de l'hématopoïèse en régulant ou étant eux-mêmes régulés par ces facteurs de transcription. En effet, GATA-1 régule l'expression du gène des miR-144/451 au cours de l'érythropoïèse (Dore *et al.*, 2008). De la même manière, le facteur PU.1 oriente les cellules vers la voie de différenciation granulo-monocytaire en induisant l'expression des miR-146a, -155 et -223 (Fukao *et al.*, 2007, Ghani *et al.*, 2011). Nous nous sommes donc intéressés à l'effet du TNF $\alpha$  sur l'expression de ces miR. Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo ont été traitées pendant 24, 48, 72 et 96h avec 20 ng/mL de TNF $\alpha$  et l'expression des différents miR a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats montrent que le TNF $\alpha$  diminue l'expression des miR-144 et -451 nécessaires à l'érythropoïèse et augmente l'expression du miR-146a qui est un inhibiteur de l'érythropoïèse après 4 jours de traitement (Figure 46). D'autre part, le TNF $\alpha$  a un effet précoce à 24h en induisant l'expression des miR-155 et -223 impliqués dans la différenciation granulo-monocytaire (Figure 47). De plus, nous avons étudié l'effet des C2-cer (30  $\mu$ M) et de la bSMase (0,5 U/mL) sur l'expression de ces miR au temps où le TNF $\alpha$  a un effet, c'est-à-dire 96h pour les miR-144, -451 et -146a et 24h pour les miR-155 et -223. Les résultats obtenus montrent que, comme le TNF $\alpha$ , les C2-cer et la bSMase diminuent l'expression des miR-144 et -451 et augmentent l'expression du miR-223 en accord avec l'inhibition de l'érythropoïèse et l'induction de la granulopoïèse alors que seul le TNF $\alpha$  est capable d'induire l'expression des miR-146a et -155 qui sont inhibiteurs de l'érythropoïèse et inducteurs de la différenciation monocyttaire. Nous avons également étudié l'effet du TNF $\alpha$  sur l'expression d'autres miR impliqués dans l'érythropoïèse (miR-16, -486) ou dans son inhibition (miR-15a, -23a, -126, -221) (Figure 48 et 49). Les résultats montrent que le TNF $\alpha$  augmente transitoirement à 24h l'expression des miR inhibiteurs -15a, -23a et -126 ainsi que l'expression du miR-16. Les résultats montrent également que l'expression du miR-486, nécessaire à l'érythropoïèse, est augmentée au cours du temps alors que l'expression du miR-221, inhibiteur de l'érythropoïèse, est diminuée en fonction du temps en présence d'Epo. Cependant, le TNF $\alpha$  n'est pas capable de moduler l'expression de ces deux miR.



**Figure 46 : Effet du TNF $\alpha$  et des céramides sur l'expression des miR-144, -451 et -146a**

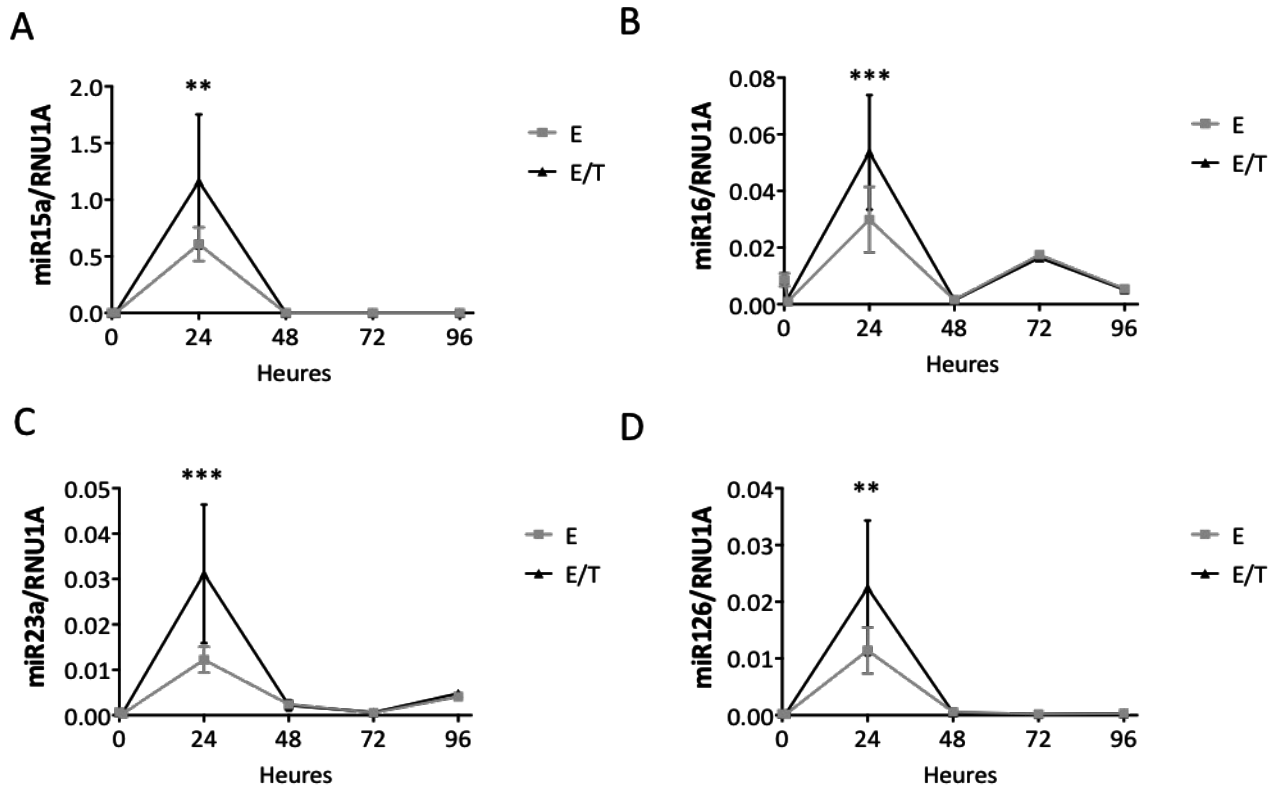
Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo (E) ont été traitées par 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T) pendant 0, 24, 48, 72 ou 96h ou avec 20 ng/mL de TNF $\alpha$ , 30  $\mu$ M de céramides C2 (C2), 0,5 U/mL de bSMase (bS) ou 20  $\mu$ M de GW4869 pendant 96 h. Les ARN totaux ont été extraits puis analysés par PCR en temps réel pour l'expression des miR-144, -451 et -146a. Les résultats calculés par la méthode du 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>, ont été normalisés par rapport au gène RNU1A. Les données représentent la moyenne de 3 ou 5 expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA 2 suivi du test de Holm-Sidak (gauche) ou par ANOVA 1 pour échantillons appariés suivi du test de Dunnet (droite) (Graphpad Prism) (\*, \$ : p<0,05, \*\* : p<0,01, \*\*\*\* : p< 0,0001). Les \* correspondent à une différence significative par rapport à l'Epo et les \$ par rapport au point Epo/TNF $\alpha$ .



**Figure 47 : Effet du TNF $\alpha$  sur l'expression des miR-155 et -223**

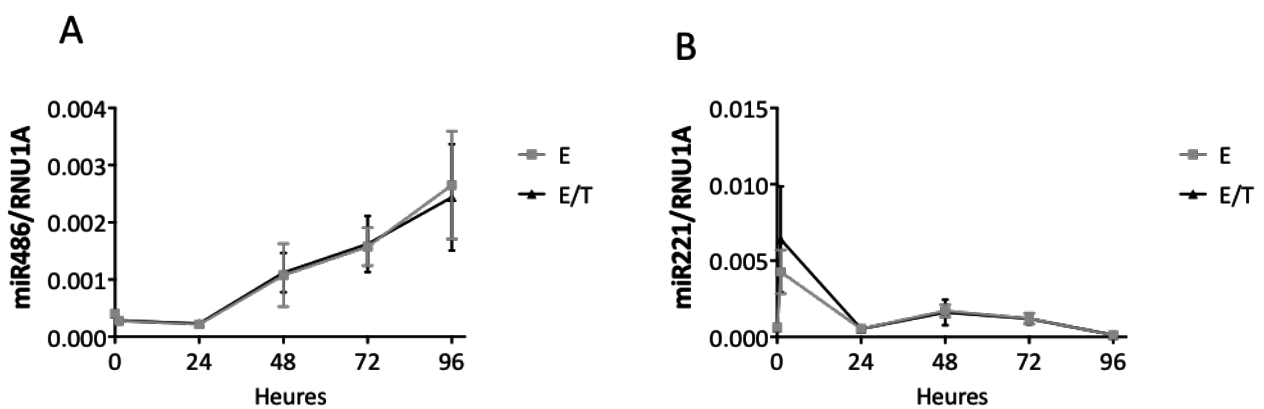
Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo (E) ont été traitées par 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T) pendant 0, 24, 48, 72 ou 96h ou avec 20 ng/mL de TNF $\alpha$ , 30  $\mu$ M de céramides C2 (C2), 0,5 U/mL de bSMase (bS) ou 20  $\mu$ M de GW4869 pendant 24h. Les ARN totaux ont été extraits puis analysés par PCR en temps réel pour l'expression des miR-155 et -223. Les résultats calculés par la méthode du 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>, ont été normalisés par rapport au gène RNU1A. Les données représentent la moyenne de 3 ou 5 expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA 2 suivi du test de Holm-Sidak (gauche) ou par ANOVA 1 pour échantillons appariés suivi du test de Dunnet (droite) (Graphpad Prism) (\*, \$ : p<0,05, \*\* : p<0,01, \*\*\*\* : p< 0,0001). Les \* correspondent à une différence significative par rapport à l'Epo et les \$ par rapport au point Epo/TNF $\alpha$ .





**Figure 48 : Expression des miR modulés par le TNF $\alpha$  à 24h**

Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo (E) ont été traitées par 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T) pendant 0, 1, 24, 48, 72 ou 96h. Les ARN totaux ont été extraits puis analysés par PCR en temps réel pour l'expression des miR-15a (A), -16 (B), -23a (C), -126 (D). Les résultats calculés par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , ont été normalisés par rapport au gène RNU1A. Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA 2 suivi du test de Holm-Sidak (Graphpad Prism) (\*\* : p < 0,01, \*\*\* : p < 0,001).



**Figure 49 : Expression des miR modulés par l'Epo**

Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo (E) ont été traitées par 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T) pendant 0, 1, 24, 48, 72 ou 96h. Les ARN totaux ont été extraits puis analysés par PCR en temps réel pour l'expression des miR-486 (A), -221 (B). Les résultats calculés par la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ , ont été normalisés par rapport au gène RNU1A. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA 2 suivi du test de Holm-Sidak (Graphpad Prism).

### 4.6.3 Conclusion

L'utilisation des céramides endogènes et exogènes ainsi que l'inhibiteur de la nSMase dans les cellules CD34<sup>+</sup> nous a permis de montrer l'implication de la voie TNF $\alpha$ /SMase/céramide dans l'inhibition de la formation de cellules érythroïdes matures ainsi que dans leur engagement vers la voie granulo-monocytaire *via* la modulation d'un microréseau de régulation miR/FT impliquant les FT GATA-1, GATA-2 et PU.1 et les miR-144/451 et 223 (Figure 50).

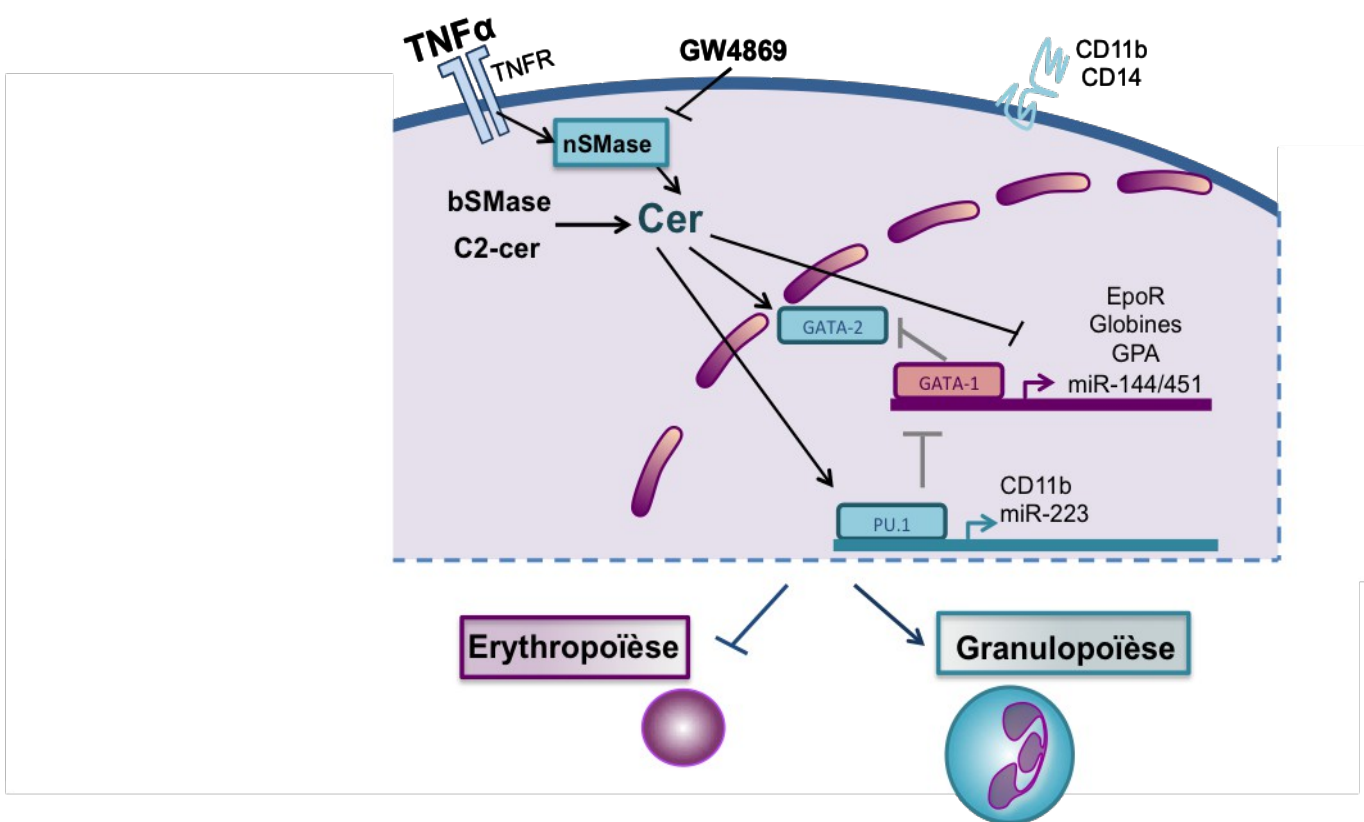


Figure 50 : La voie TNF $\alpha$ /nSMase/Ceramide est impliquée dans l'inhibition de l'érythropoïèse et l'induction de la granulopoïèse

## **4.7 Implication de l'autophagie dans l'inhibition de l'érythropoïèse par la voie TNF $\alpha$ /Sphingomyélinase neutre/ Céramide**

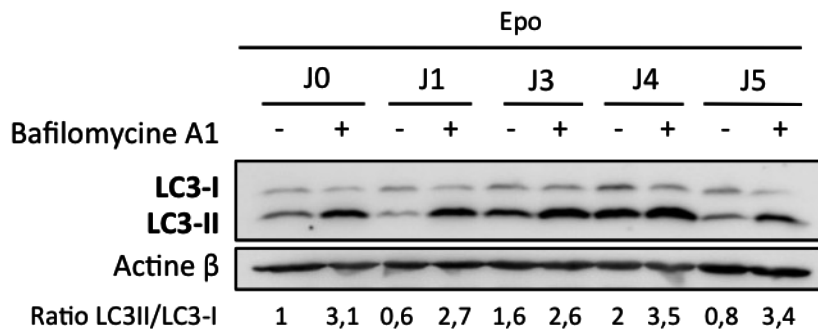
L'autophagie est un phénomène physiologique essentiel au développement érythroïde alors qu'elle a été décrite comme inversement corrélée au niveau de différenciation des neutrophiles (Rozman *et al.*, 2015). Sa dérégulation peut donc conduire à une inhibition de l'érythropoïèse. C'est un processus très régulé notamment par les sphingolipides et les enzymes impliquées dans leur métabolisme. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet du TNF $\alpha$  et des céramides sur l'autophagie au cours de la différenciation des CSPH CD34<sup>+</sup> induites par l'Epo.

### **4.7.1 Evaluation de l'induction de l'autophagie dans les CSPH CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo**

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'induction de l'autophagie dans notre modèle en étudiant la conversion de la protéine LC3 qui est importante pour la formation des autophagosomes. En effet, au cours du processus d'autophagie, LC3 est clivée générant ainsi la forme LC3-I qui s'associe directement à la phosphatidyléthanolamine pour donner la forme convertie LC3-II que l'on retrouve au niveau des membranes des autophagosomes. Lors de la fusion des autophagosomes avec les lysosomes, LC3-II est dégradée avec le reste du contenu des autolysosomes. La bafilomycine A1 est un inhibiteur du flux autophagique. Elle empêche la maturation des vésicules autophagiques en bloquant la fusion des autophagosomes avec les lysosomes et permet ainsi d'observer l'accumulation de la forme LC3-II qui témoigne de la présence d'un flux autophagique. Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo ont été traitées ou non avec 40 nM de bafilomycine A1, puis la conversion de LC3 a été analysée par Western Blot aux jours 0, 1, 3, 4 et 5 (Figure 51). Les résultats obtenus montrent une conversion de LC3 au cours du temps en accord avec l'induction de l'autophagie dans les CSPH CD34<sup>+</sup>.

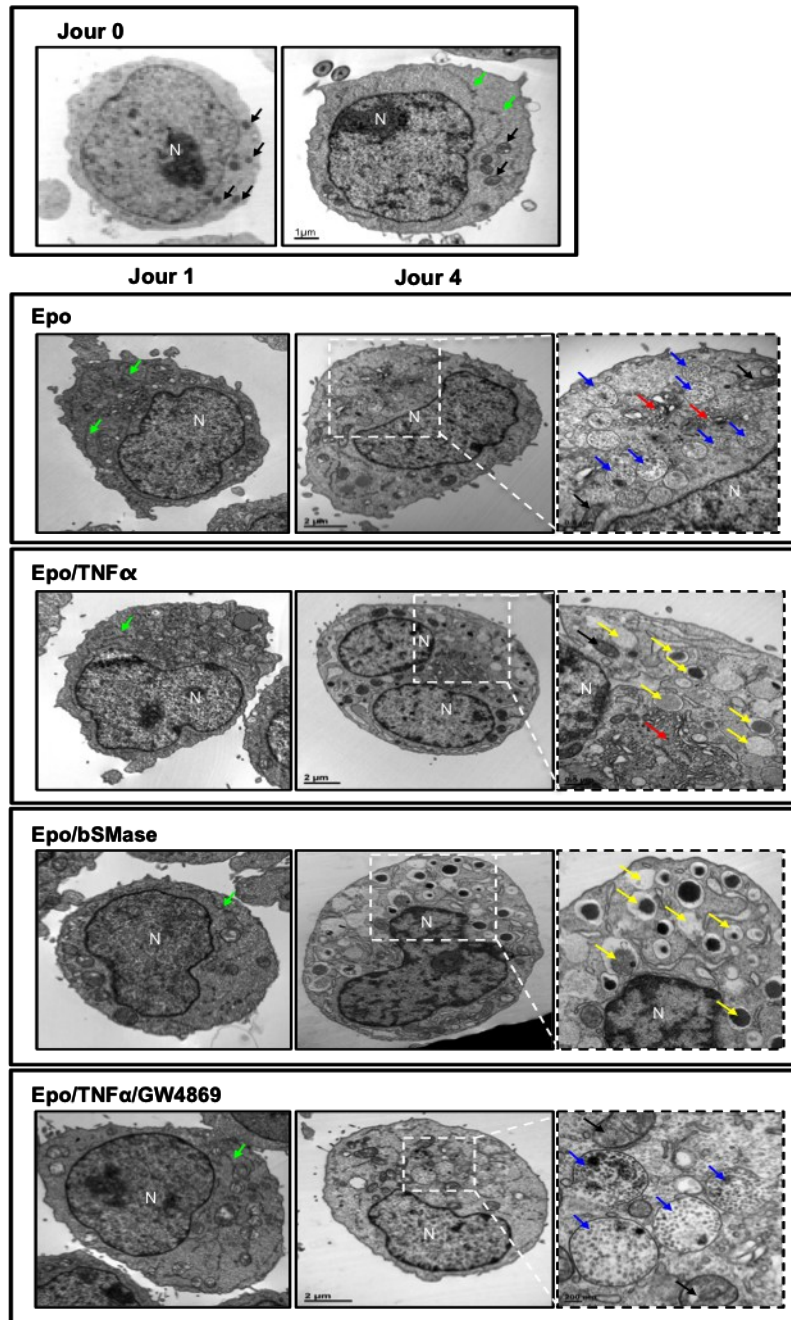
### **4.7.2 Etude de l'effet du TNF $\alpha$ et des céramides sur l'autophagie par microscopie électronique à transmission**

Les cellules CD34<sup>+</sup> ont été stimulées par 2 U/mL d'Epo et traitées par 20 ng/mL de TNF $\alpha$ , 0,5 U/mL de bSMase ou 20  $\mu$ M de GW4869 pendant 4 jours. Les cellules ont été fixées puis des coupes ont été réalisées afin d'observer les structures cellulaires par microscopie électronique à transmission (Figure 52). Les résultats montrent qu'au jour 0, avant stimulation par l'Epo, les cellules présentent les caractéristiques des CSH avec un noyau volumineux, quelques mitochondries et de rares membranes isolées (phagophores) correspondant aux premières étapes de l'autophagie. Après 4 jours de traitement à l'Epo, l'autophagie physiologique est en place avec la formation de structures autophagiques plus tardives comme la présence de très nombreux autophagosomes et autolysosomes de maturité variable.



**Figure 51 : Effet de l'Epo sur la conversion de la protéine LC3**

Les cellules CD34<sup>+</sup> ont été traitées avec 2 U/mL d'Epo (E) en présence ou en absence de 40 nM de bafilomycine A1 pendant 1, 3, 4 et 5 jours (J1, J3, J4, J5). Le Western Blot a été réalisé à partir d'extraits totaux. L'actine  $\beta$  est utilisée comme contrôle interne de dépôt des échantillons. Le ratio LC3II/LC3I correspond au rapport de l'intensité de la bande formée par LC3-II sur celle de LC3-I normalisé à l'actine  $\beta$ , le contrôle étant normalisé à 1. Les résultats montrent une expérience représentative parmi 3.



**Figure 52 : Effet du TNF $\alpha$  et des céramides sur l'autophagie**

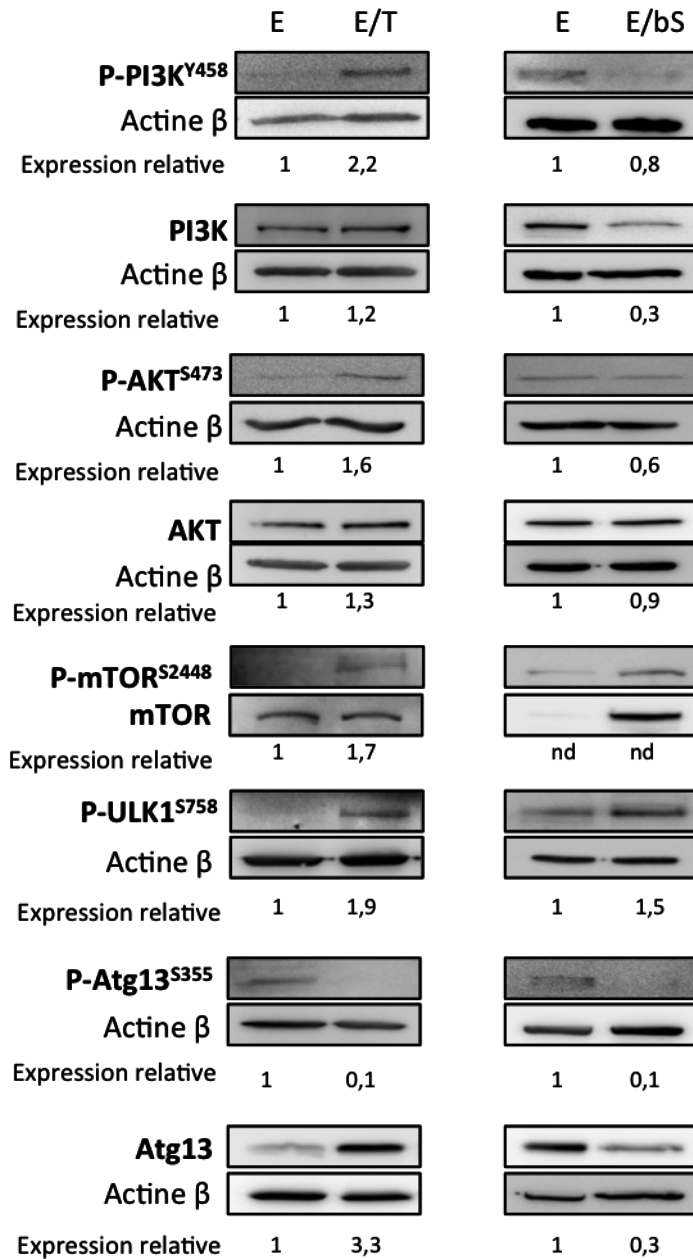
Les cellules CD34<sup>+</sup> au jour 0 (J0) avant traitement ou stimulées par 2 U/mL d'Epo ont été traitées par 20 ng/mL de TNF $\alpha$ , 0,5 U/mL de bSMase et 20  $\mu$ M de GW4869 pendant 24h et 4 jours puis ont été observées par microscopie électronique à transmission (MET). Les flèches noires pointent les mitochondries, les flèches rouges l'appareil de Golgi, les vertes correspondent aux phagophores, les rouges aux autophagosomes/autolysosomes et les flèches jaunes aux granules et vésicules de sécrétion. N : Noyau.

Dans les conditions de traitements inhibiteurs de l'érythropoïèse avec le TNF $\alpha$  et la bSMase, les images montrent clairement une diminution du nombre de cellules présentant des caractéristiques de cellules autophagiques tardives, alors que nous observons un noyau plurilobé et une accumulation de granules et vésicules de sécrétion caractéristiques des PNN confirmant non seulement un effet inhibiteur du TNF $\alpha$  sur l'autophagie nécessaire à l'érythropoïèse mais aussi l'induction de la différenciation granulocytaire.

### **4.7.3 Effet du TNF $\alpha$ sur les protéines régulatrices de l'autophagie**

#### **4.7.3.1 PI3K/AKT/mTOR/ULK1/Atg13**

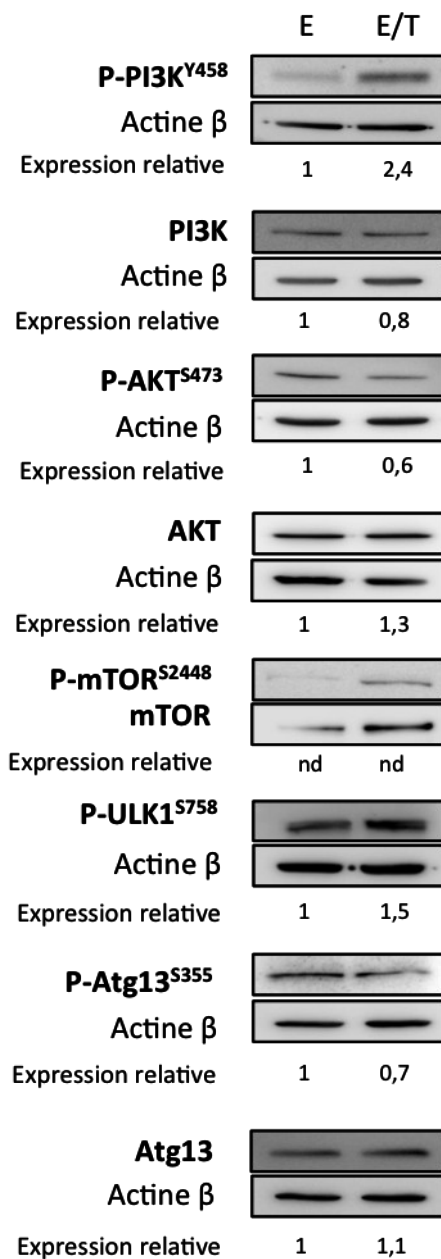
L'autophagie est un processus complexe qui est régulé à différents niveaux. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'effet du TNF $\alpha$  et des céramides sur l'étape d'induction de l'autophagie en analysant la cascade de signalisation PI3K/AKT/mTOR/ULK1/Atg13. La voie PI3K/AKT régule l'activité de mTOR, une des protéines inhibitrices de l'autophagie qui bloque la kinase activatrice ULK1 par une phosphorylation spécifique au niveau de la sérine S758 qui ne peut alors plus phosphoryler son substrat Atg13. Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo ont été traitées pendant 4 jours avec du TNF $\alpha$  ou la bSMase. Les phosphorylations activatrices des protéines PI3K, AKT, mTOR et Atg13 ainsi que la phosphorylation inhibitrice de ULK1 ont été analysées par Western Blot (Figure 53). Les résultats montrent que le TNF $\alpha$  induit la cascade de phosphorylations PI3K<sup>Y458</sup>/AKT<sup>S473</sup>/mTOR<sup>S2448</sup>, alors que la bSMase induit une augmentation de l'expression et de la phosphorylation de mTOR<sup>S2448</sup> mais de manière indépendante de la voie PI3K/AKT. L'activation de mTOR est confirmée par l'étude de la phosphorylation inhibitrice de ULK1. En effet, nous pouvons observer que le TNF $\alpha$  et la bSMase induisent la phosphorylation inhibitrice de ULK1<sup>S758</sup> alors que l'expression des protéines totales n'est pas modifiée par le traitement. L'inactivation de la kinase ULK1 est ensuite vérifiée en analysant la phosphorylation de son substrat Atg13 au niveau de la sérine 355. Les résultats montrent que le TNF $\alpha$  et les céramides empêchent la phosphorylation d'Atg13<sup>S355</sup> en accord avec l'activation de mTOR, l'inhibition de ULK1 et l'inhibition de l'autophagie. Nous nous sommes également intéressés à l'activation de cette voie à des temps de traitement plus courts (Figure 54). Les résultats obtenus après 24h de traitement au TNF $\alpha$ , montrent une induction incomplète de cette cascade de phosphorylations, suggérant la mise en place progressive de la voie inhibitrice de l'induction de l'autophagie. Dans le but de confirmer ces résultats, nous avons étudié l'effet d'un inhibiteur de mTOR, la rapamycine sur l'érythropoïèse. Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées à l'Epo ont été traitées pendant 4 jours avec du TNF $\alpha$  ou la bSMase en présence ou en absence de 50 nM de rapamycine puis l'effet des traitements sur la production d'Hb a été évalué par un test de coloration à la benzidine (Figure 55). Les résultats obtenus montrent que



**Figure 53 : Effet du TNF $\alpha$  et des céramides sur la phosphorylation de PI3K, AKT, mTOR, ULK1 et Atg13 à 4 jours**

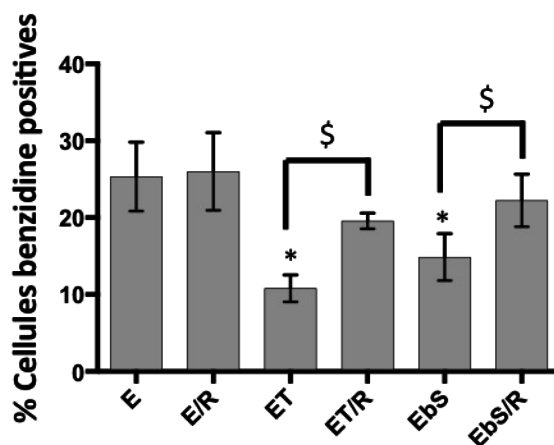
Les cellules CD34<sup>+</sup> ont été traitées avec 2 U/mL d'Epo (E) et 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T) ou 0,5 U/mL de bSMase (bS) pendant 4 jours. Les Western Blots ont été réalisés à partir d'extraits totaux. L'actine  $\beta$  est utilisée comme contrôle interne de dépôt des échantillons. Les résultats montrent une expérience représentative parmi 3. L'expression relative correspond au rapport de l'intensité de la bande correspondant à la protéine étudiée sur celle de l'actine  $\beta$ , le contrôle étant normalisé à un. Nd : non déterminé





**Figure 54 : Effet du TNF $\alpha$  sur la voie PI3K/AKT/mTOR/ULK/Atg13 à 24h**

Les cellules CD34<sup>+</sup> ont été traitées avec 2 U/mL d'Epo (E) et 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T) pendant 24h. Les Western Blots ont été réalisés à partir d'extraits totaux. L'actine  $\beta$  est utilisée comme contrôle interne de dépôt des échantillons. Les résultats montrent une expérience représentative parmi 3. L'expression relative correspond au rapport de l'intensité de la bande correspondant à la protéine étudiée sur celle de l'actine  $\beta$ , le contrôle étant normalisé à un. Nd : non déterminé



**Figure 55 : Effet de la rapamycine sur la production d'hémoglobine**

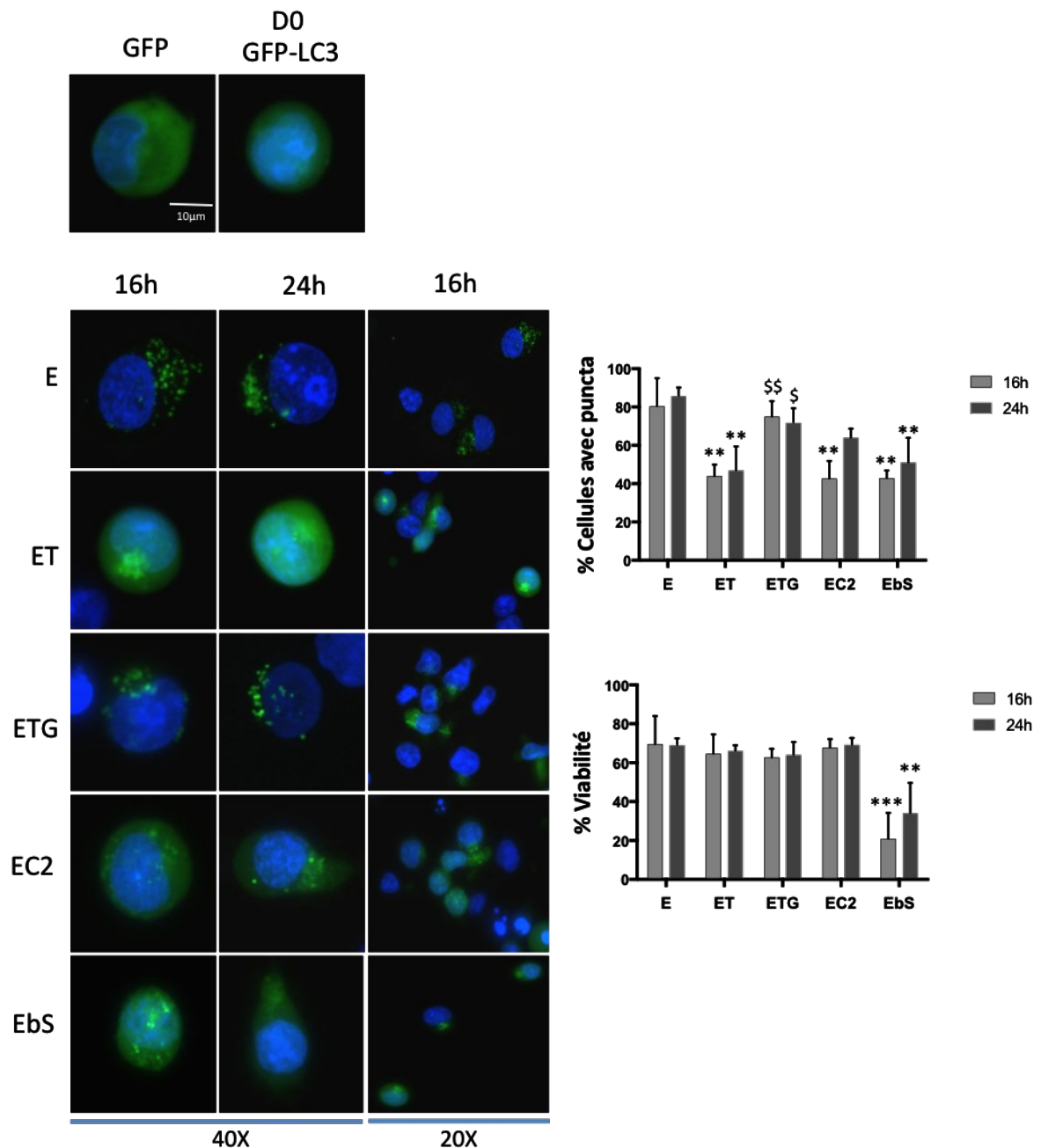
Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo (E) ont été traitées par 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T) ou 0,5 U/mL de bSMase (bS) en présence ou en absence de 50 nM de rapamycine (R) pendant 4 jours. L'effet des traitements sur la différenciation érythroïde a été évalué par un test de coloration à la benzidine.

Les données représentent la moyenne de 4 expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA 1 en mesures répétées suivi du test de Dunnet (Graphpad Prism). Les \* correspondent à une différence significative par rapport à l'Epo (\*,\$ : p<0,05).

la rapamycine n'a pas d'effet sur les cellules traitées à l'Epo. En revanche, elle est capable de prévenir l'effet inhibiteur du TNF $\alpha$  et de la bSMase démontrant le rôle essentiel de mTOR dans l'inhibition de l'autophagie et de l'érythropoïèse par le TNF $\alpha$ .

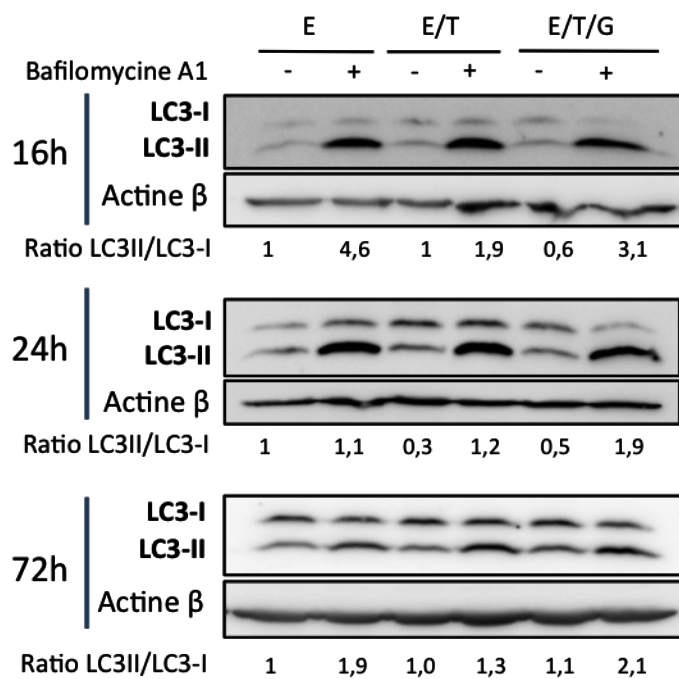
#### 4.7.3.2 LC3/Atg5-12/Atg7

De plus, nous avons également évalué l'effet du TNF $\alpha$  sur l'étape de formation des autophagosomes. Cette étape est permise grâce à deux systèmes de conjugaison qui se mettent en place parallèlement et qui sont tous deux catalysés par la protéine Atg7. D'une part, il y a formation du complexe Atg5/Atg12/Atg16 et d'autre part, la conversion de LC3 en LC3-II qui devient conjugué à la phosphatidyléthanolamine. Nous avons étudié l'effet de l'Epo et du TNF $\alpha$  sur la distribution cellulaire de la protéine LC3 par microscopie à fluorescence. Les cellules CD34<sup>+</sup> ont été transfectées par nucléofection au jour 0 avec 5  $\mu$ g d'un plasmide contrôle exprimant la GFP ou 5  $\mu$ g du plasmide pSelectGFP-LC3. Les cellules transfectées ont été traitées avec de l'Epo, 20 ng/mL de TNF $\alpha$ , 30  $\mu$ M de C2-cer, 0,5 U/mL de bSMase et 20  $\mu$ M de GW et analysées par microscopie à fluorescence après 16 et 24h (Figure 56). Les résultats obtenus montrent que l'Epo induit dès 16h la formation de *punctae* caractéristiques de l'autophagie en comparaison avec les cellules non traitées au jour 0 qui présentent un signal diffus. Après 16h de traitement au TNF $\alpha$ , aux C2-cer et à la bSMase, les cellules présentent un signal diffus avec de rares *punctae* similaires aux cellules non traitées au jour 0. De plus, le GW est capable de bloquer l'effet du TNF $\alpha$  et de restaurer le pourcentage de cellules présentant des *punctae*. L'effet de la transfection et des différents traitements sur la viabilité cellulaire est relativement faible avec une viabilité d'environ 60% excepté pour la bSMase qui présente une viabilité comprise entre 20 et 40%. Ensemble, ces résultats suggèrent que la voie nSMase/céramide est impliquée dans l'inhibition de l'autophagie par le TNF $\alpha$  en accord avec l'inhibition de l'érythropoïèse. L'effet du TNF $\alpha$  a été évalué également en examinant la conversion de LC3 par Western blot (Figure 57). Les cellules CD34<sup>+</sup> ont été traitées pendant 16, 24 et 72h avec l'Epo, le TNF $\alpha$  et le GW en présence ou en absence de 40 nM de bafilomycine A1. Les résultats confirment comme dans la figure 51, que l'Epo induit la conversion de LC3. Etonnamment, les Western Blots ne permettent pas d'observer de diminution de la conversion de LC3 par le TNF $\alpha$ . Ce résultat suggère que le TNF $\alpha$  n'est pas capable d'empêcher la conversion de LC3 quel que soit le temps de traitement et diverge avec les résultats obtenus par microscopie à fluorescence qui montrent un effet évident du TNF $\alpha$  sur la localisation et la concentration de LC3 sous forme de *punctae* GFP-LC3, caractéristiques de l'autophagie.



**Figure 56 : Effet du TNF $\alpha$  et des céramides sur la répartition cellulaire de LC3**

Les cellules CD34<sup>+</sup> ont été transfectées par nucléofection avec 5  $\mu$ g d'un plasmide contrôle exprimant la GFP ou avec 5  $\mu$ g du plasmide pSelectGFP-LC3 puis traitées avec 2 U/mL d'Epo (E) ou 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T), 30  $\mu$ M de C2-cer (C2), 0,5 U/mL de bSMase (bS) et 20  $\mu$ M de GW4869 (G) puis observées au microscope à fluorescence au jour 0 et après 16 et 24h de traitement. Les images ont été prises au grossissement 20 ou 40X et sont représentatives de trois expériences indépendantes. La quantification du nombre de cellules présentant des *punctae* ainsi que la viabilité cellulaire évaluée par un test d'exclusion au bleu de Trypan sont représentées par les graphiques. Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA 2 suivi du test de Holm-Sidak (Graphpad Prism) (\*, \$ : p<0,05, \*\* : p<0,01) Les \* correspondent à une différence significative par rapport point E et les \$ par rapport au point E/T.



**Figure 57 : Effet du TNF $\alpha$  et du GW4869 sur la conversion de LC3**

Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées à l'Epo (E) ont été traitées pendant 16, 24 et 72h avec 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T), 20  $\mu$ M de GW4869 (G) en présence ou en absence de 40 nM de bafilomycine A1. Le Western Blot a été réalisé à partir d'extraits totaux. L'actine  $\beta$  est utilisée comme contrôle interne de dépôt des échantillons. Les résultats montrent une expérience représentative parmi 3. Le ratio LC3-II/LC3-I correspond au rapport de l'intensité de la bande correspondant à LC3-II sur celle de LC3-I normalisé à l'actine  $\beta$ , le contrôle étant normalisé à 1.

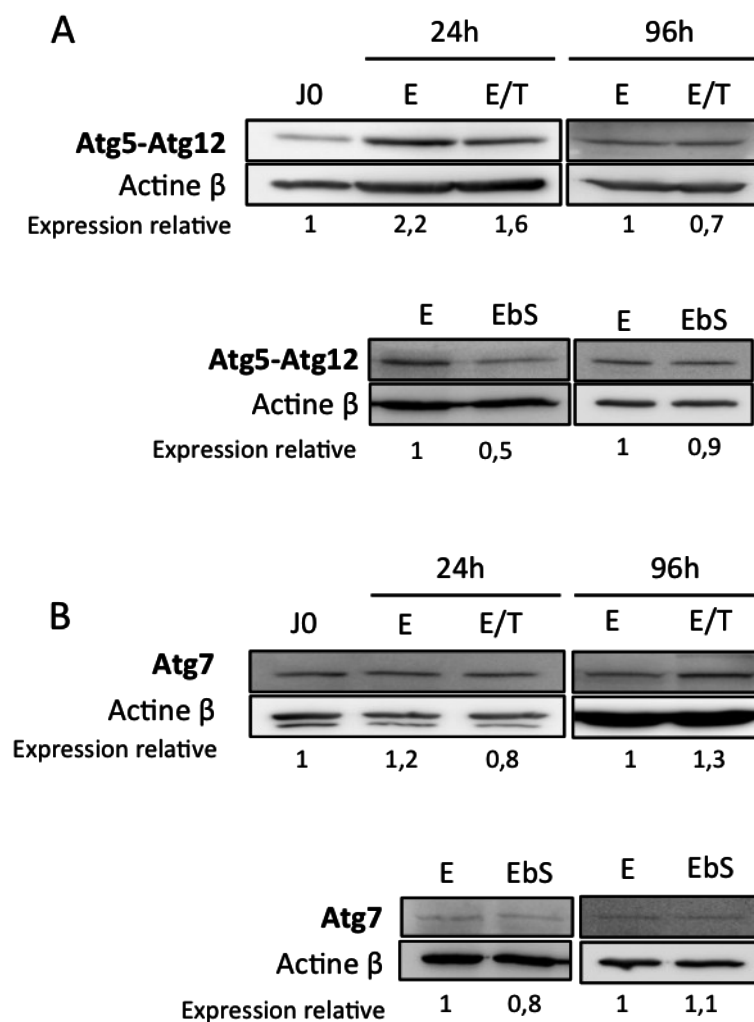
Nous avons poursuivi notre étude par l'analyse de la formation du complexe Atg5-Atg12 et de l'expression de la protéine Atg7 par Western Blot. Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo ont été traitées pendant 24h et 4 jours avec 20 ng/mL de TNF $\alpha$  ou 0,5 U/mL de bSMase. L'analyse de l'expression du complexe Atg5-Atg12 et de la protéine Atg7 montre que l'Epo induit dès 24h la formation du complexe Atg5-Atg12 par rapport au jour 0 et que le TNF $\alpha$  et la bSMase sont capables de diminuer la formation de ce complexe à 24h (Figure 58). En revanche, la formation du complexe Atg5-Atg12 n'est pas affectée après 4 jours de traitement et l'expression de la protéine Atg7 ne varie ni à 24h, ni après 4 jours de traitement.

#### **4.7.3.3 SQSTM1/p62**

Nous nous sommes également intéressés à l'expression de la protéine SQSTM1/p62, qui se lie à LC3 au niveau de la membrane de l'autophagosome et est dégradée lors de la fusion avec le lysosome. Les cellules CD34<sup>+</sup> ont été traitées avec 2 U/mL d'Epo pendant 0, 1, 3, 4 ou 5 jours et l'expression de p62 a été analysée par Western Blot (Figure 59A). Les résultats montrent que l'Epo induit une diminution de p62 en fonction du temps en corrélation avec l'induction de l'autophagie. Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo ont été traitées avec 20 ng/mL de TNF $\alpha$ , 0,5 U/mL de bSMase pendant 4 jours, puis l'expression de p62 a été analysée par Western Blot (Figure 59B). Les résultats montrent que le TNF $\alpha$  et la bSMase induisent une accumulation de p62 en accord avec une inhibition de sa dégradation qui se produit lors d'un arrêt du processus d'autophagie.

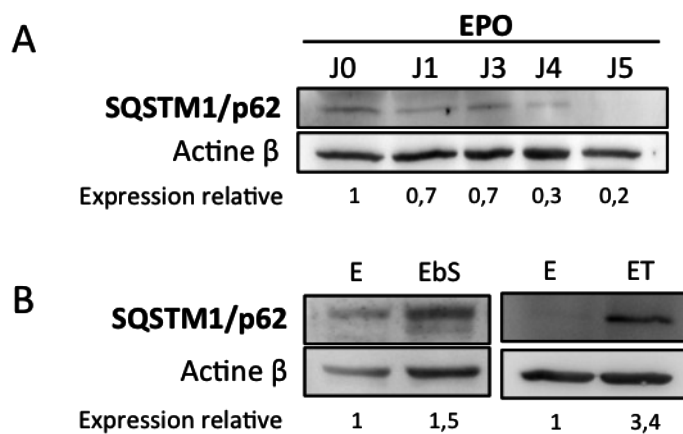
#### **4.7.3.4 Beclin 1 et RUBICON**

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet du TNF $\alpha$  et des céramides sur des protéines inhibitrices de la fusion autophagosome/lysosome. La protéine beclin 1 appartient à différents complexes protéiques qui peuvent jouer un rôle activateur ou inhibiteur de l'autophagie selon les protéines qui le constituent. Lorsque beclin 1 est liée à la protéine RUBICON, le complexe formé inhibe la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Matsunaga *et al.*, 2009). Nous avons donc analysé par Western Blot l'expression des deux protéines beclin 1 (Figure 60A) et RUBICON (Figure 60B) dans les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo et traitées avec 20 ng/mL de TNF $\alpha$  ou 0,5 U/mL de bSMase pendant 24h et 4 jours. Les résultats obtenus montrent que l'Epo induit l'expression de beclin 1 après 24h en comparaison avec le jour 0 (J0) et que le TNF $\alpha$  et la bSMase sont capables de diminuer son expression à 24h en corrélation avec une inhibition de l'autophagie. Cependant, son expression est augmentée après 4 jours de traitement au TNF $\alpha$ . De plus, on peut observer qu'à 24h, l'Epo diminue l'expression de l'inhibiteur RUBICON et que le TNF $\alpha$  n'a pas



**Figure 58 : Effet du TNF $\alpha$  et des céramides sur la formation du complexe Atg5-Atg12 et l'expression d'Atg7**

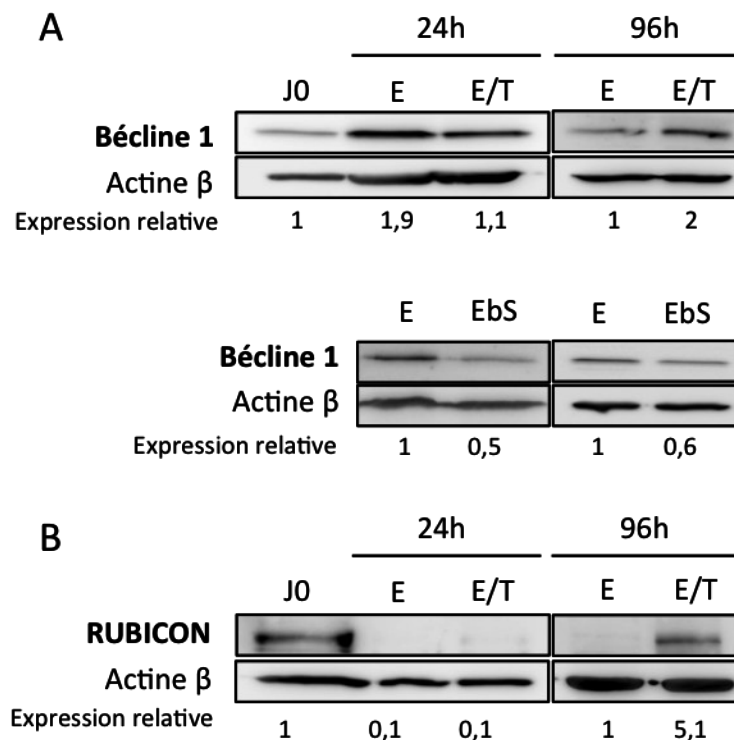
Les cellules CD34<sup>+</sup> ont été non traitées (J0) ou traitées avec 2 U/mL d'Epo (E) et 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T) ou de bSMase (bS) pendant 24h et 4 jours et la formation du complexe Atg5-Atg12 (**A**) et l'expression d'Atg7 (**B**) a été analysé par Western Blot à partir d'extraits totaux. L'actine  $\beta$  est utilisée comme contrôle interne de dépôt des échantillons. Les résultats montrent une expérience représentative parmi 3. L'expression relative correspond au rapport de l'intensité de la bande correspondant à la protéine étudiée sur celle de l'actine  $\beta$ , le contrôle étant normalisé à 1.



**Figure 59 : Effet du TNF $\alpha$  et des céramides sur l'expression de p62**

Les cellules CD34<sup>+</sup> ont été traitées avec 2 U/mL d'Epo (E) pendant 1, 2, 3, 4 et 5 jours (**A**) ou stimulées avec l'Epo et traitées avec 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T), 0,5 U/mL de bSMase (bS) pendant 4 jours (**B**). Les Western Blots ont été réalisés à partir d'extraits cytoplasmiques. L'actine  $\beta$  est utilisée comme contrôle interne de dépôt des échantillons. L'expression relative correspond au rapport de l'intensité de la bande correspondant à la protéine étudiée sur celle de l'actine  $\beta$ , le contrôle étant normalisé à 1. Les résultats montrent une expérience représentative parmi 3.





**Figure 60 : Effet du TNF $\alpha$  sur l'expression des protéines beclin 1 et RUBICON**

Les cellules CD34<sup>+</sup> ont été non traitées (JO) ou traitées avec 2 U/mL d'Epo (E) et 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T), ou 0,5 U/mL de bSMase (bS) pendant 24h et 4 jours. Les Western Blots ont été réalisés à partir d'extraits totaux. L'actine  $\beta$  est utilisée comme contrôle interne de dépôt des échantillons. L'expression relative correspond au rapport de l'intensité de la bande formée par la protéine étudiée sur celle de l'actine  $\beta$ , le contrôle étant normalisé à 1. Les résultats montrent une expérience représentative parmi 3.

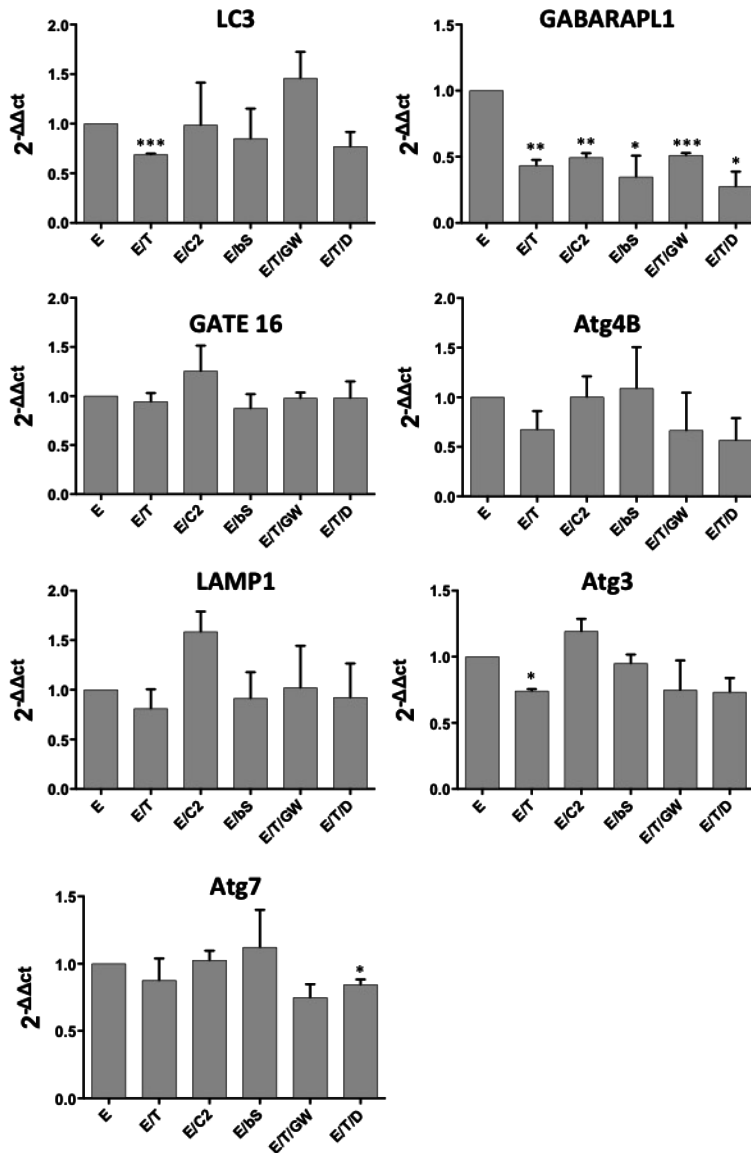
d'effet. En revanche, après 4 jours de traitement, le TNF $\alpha$  induit l'expression de la protéine beclin 1 mais aussi de l'inhibiteur RUBICON.

#### **4.7.4 Effet du TNF $\alpha$ et des céramides sur l'expression des gènes codant les protéines de l'autophagie**

Les résultats précédents montrent que le TNF $\alpha$  est un inhibiteur de l'autophagie dans les CSPH CD34<sup>+</sup>. Nous avons ensuite analysé l'expression de gènes cibles du facteur GATA-1 impliqués dans l'autophagie étant donné que son inhibiteur PU.1 est surexprimé en présence de TNF $\alpha$  (Grigorakaki *et al.*, 2011). En effet, GATA-1 induit l'expression des gènes codant les protéines de la famille Atg8 : MAP1LC3 (LC3), GABARAPL1 et GATE16, mais aussi Atg4B qui est nécessaire à la maturation des autophagosomes ainsi que des protéines lysosomales comme LAMP-1 nécessaires à la fusion autophagosome/lysosome alors qu'il n'induit pas l'expression d'Atg3 et d'Atg7 par exemple (Huynh *et al.*, 2007, Kang *et al.*, 2012, Betin *et al.*, 2013). Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo ont été traitées pendant 4 jours avec 20 ng/mL de TNF $\alpha$ , 30  $\mu$ M de C2-cer, 0,5 U/mL de bSMase, 20  $\mu$ M de GW ou 10  $\mu$ M de Des. L'expression de LC3, GABARAPL1, GATE16, Atg4b et LAMP-1 ainsi que celle de gènes codant des protéines de l'autophagie non régulés par GATA-1 comme Atg3 et Atg7 a été analysée par PCR en temps réel (Figure 61). Les résultats obtenus montrent que seule l'expression des ARNm de LC3 et de GABARAPL1 est diminuée par le TNF $\alpha$ . De plus, l'ARNm d'Atg3 dont l'expression n'est pas régulée par GATA-1, est également diminué. Il n'y a donc pas de lien direct entre l'effet du TNF $\alpha$  sur l'activité de GATA-1 et l'expression de ces gènes liés à l'autophagie. De plus, nous pouvons observer que le GW4869 permet de restaurer l'expression de l'ARNm de LC3. Cependant, les C2-cer et la bSMase ne sont pas capables de diminuer son expression. Nous observons également que les C2-cer et la bSMase diminuent l'expression de GABARAPL1 de manière comparable au TNF $\alpha$  alors que l'expression des autres gènes n'est pas affectée. Cependant, le GW n'est pas capable de restaurer l'expression de GABARAPL1 suggérant que d'autres voies induites par le TNF $\alpha$  sont impliquées dans cette inhibition.

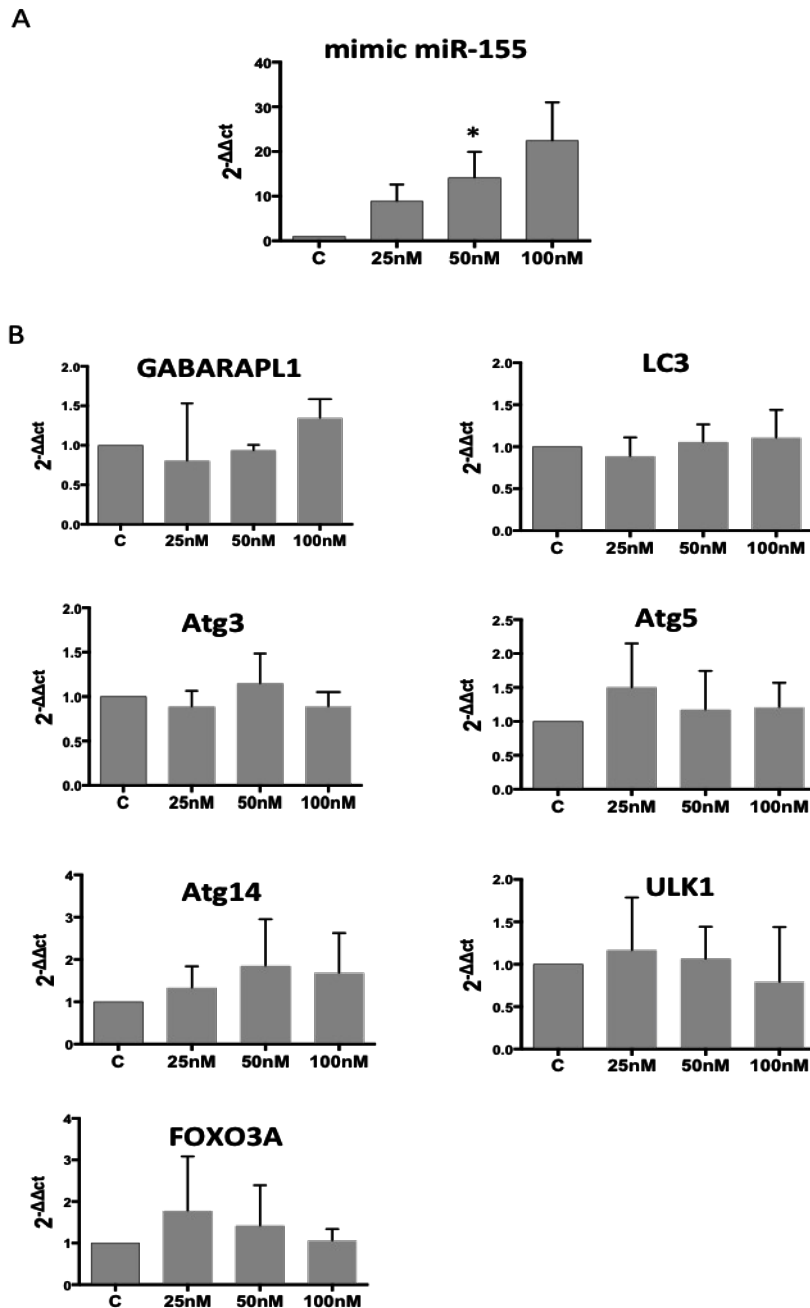
#### **4.7.5 Implication du miR-155 dans l'inhibition de l'autophagie**

Les résultats précédents ont montré que le TNF $\alpha$  induit fortement l'expression du miR-155 dans les cellules CD34<sup>+</sup> induites par l'Epo (Figure 47). D'Adamo *et al.*, ont montré dans des chondrocytes humains que ce miR pouvait avoir pour cibles les ARNm de nombreuses protéines impliquées dans l'autophagie tels que LC3, GABARAPL1, ULK1, FOXO3, Atg14, Atg5 et Atg3 (D'Adamo *et al.*, 2016).



**Figure 61 : Effet du TNF $\alpha$  et des céramides sur l'expression des gènes codant les protéines de l'autophagie**

Les cellules CD34<sup>+</sup> stimulées par l'Epo (E) ont été traitées par 20 ng/mL de TNF $\alpha$  (T), avec 30  $\mu$ M de céramides C2 (C2) ou 0,5 U/mL de bSMase (bS), 20  $\mu$ M de GW4869 (G) et 10  $\mu$ M de désipramine (D) pendant 24h. Les ARN totaux ont été extraits puis analysés par PCR en temps réel pour l'expression de LC3, GABARAPL1, GATE16, Atg4B, LAMP-1, Atg3 et Atg7. Les résultats calculés par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , ont été normalisés par rapport au gène de l'actine. Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA 1 pour échantillons appariés suivi du test de Dunnet (Graphpad Prism) (\* : p<0,05; \*\* : p<0,01;\*\*\* : p<0,001).



**Figure 62 : Effet d'un analogue du miR-155 sur ses cibles impliquées dans l'autophagie**

Les cellules CD34<sup>+</sup> ont été transfectées avec 25, 50 ou 100 nM d'un analogue du miR-155. Les ARN totaux ont été extraits puis analysés par PCR en temps réel après 24h pour l'expression du miR-155 (A), de LC3, GABARAPL1, Atg3, Atg5, Atg14, ULK1 et FOXO3A (B). Les résultats calculés par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ont été normalisés par rapport au gène RNU1A pour le miR-155 et de l'actine  $\beta$  pour les autres. Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et ont été analysées par ANOVA 1 pour échantillons appariés suivi du test de Dunnet (Graphpad Prism) (\* :  $p < 0,05$ ).

Nous nous sommes donc intéressés à l'effet du miR-155 sur les ARNm codant les protéines impliquées dans l'autophagie. Les cellules CD34<sup>+</sup> ont donc été transfectées avec différentes concentrations (25, 50 et 100 nM) d'un analogue du miR-155 puis l'expression du miR-155 (Figure 62A) ainsi que de ses cibles potentielles (Figure 62B) a été analysée par PCR en temps réel 24h après la transfection. Les résultats obtenus montrent que l'expression du miR-155 augmente de manière dépendante de la concentration d'analogue transfecté et que l'expression basale des ARNm des cibles potentielles n'est pas affectée après transfection de l'analogue.

#### 4.7.6 Conclusion

Les résultats obtenus par MET et l'analyse des cellules transfectées avec un plasmide GFP-LC3 démontrent que le TNF $\alpha$  et les céramides bloquent l'autophagie dans les CSPH CD34<sup>+</sup> en corrélation avec une inhibition de l'érythropoïèse. Cet effet est confirmé au niveau moléculaire puisque le TNF $\alpha$  et les céramides activent mTOR en corrélation avec une inhibition de ULK1 et d'Atg13. De plus, le TNF $\alpha$  et les céramides sont capables de diminuer la formation du complexe Atg5-Atg12 ainsi que l'expression de beclin 1. L'accumulation de p62 dans les cellules traitées au TNF $\alpha$  et aux céramides ainsi que l'augmentation de l'expression de la protéine RUBICON par le TNF $\alpha$  à 4 jours suggèrent une inhibition de la fusion autophagosome/lysosome (Figure 63).

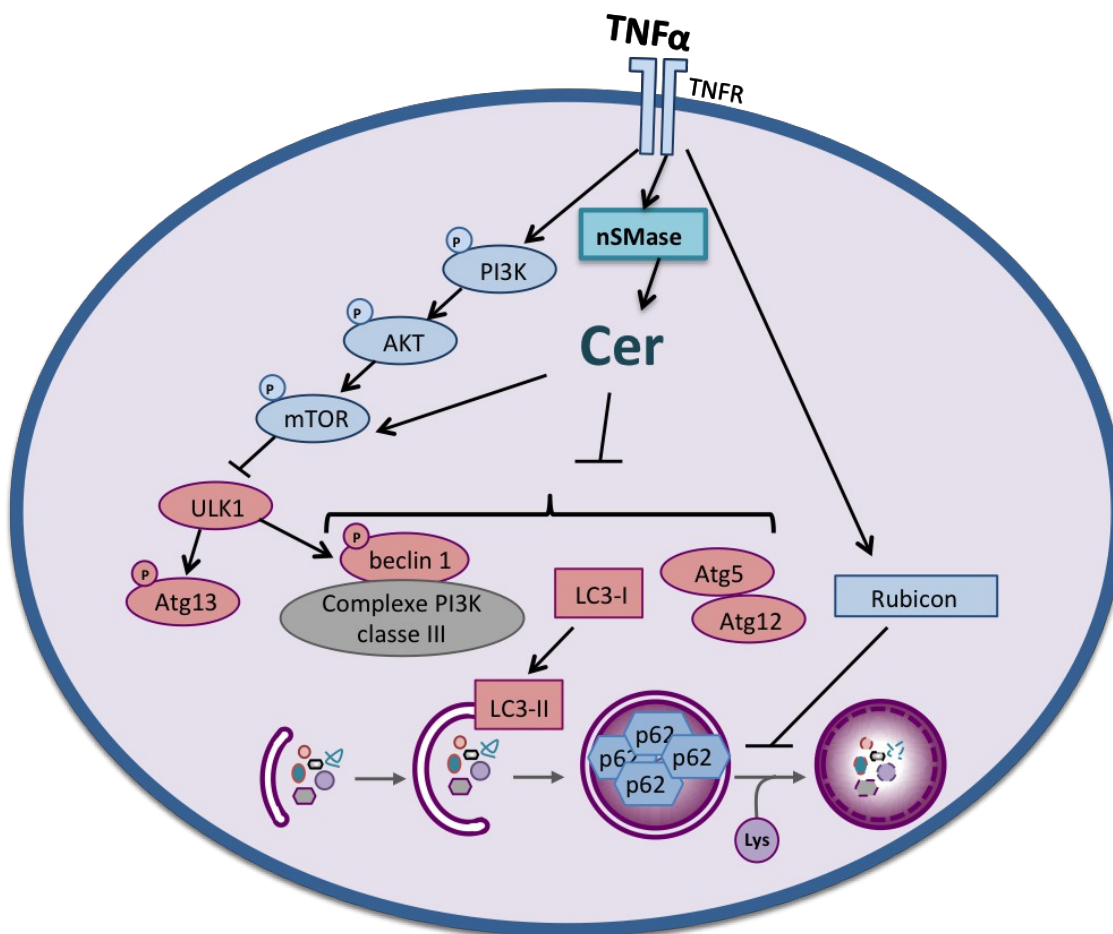


Figure 63 : Effet du TNF $\alpha$  et des céramides sur l'autophagie

## 5 Discussion

Chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques ou de cancer, l'anémie est considérée comme un facteur aggravant car elle affecte considérablement la qualité et l'espérance de vie. L'importante production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  conduit à une inhibition du développement érythroïde *in vitro* et *in vivo* (Johnson *et al.*, 1989, Spivak, 2005, Morceau *et al.*, 2006, Buck *et al.*, 2008, Buck *et al.*, 2009, Grigorakaki *et al.*, 2011, Gilreath *et al.*, 2014). Les transfusions sanguines et l'administration d'ESA sont les principaux traitements des anémies liées au cancer. Les risques associés aux ESA doivent cependant être pris en compte car malgré leur efficacité contre l'anémie, il a été montré que ces substances sont susceptibles de favoriser le développement tumoral (Littlewood *et al.*, 2001, Bennett *et al.*, 2008, Bohlius *et al.*, 2009, Glaspy *et al.*, 2010, Debeljak *et al.*, 2014, Leyland-Jones *et al.*, 2016).

Ce travail a pour objectif d'apporter de nouvelles données scientifiques concernant l'activité inhibitrice du TNF $\alpha$  sur le développement érythroïde à travers l'utilisation des CSPH CD34<sup>+</sup> comme modèle cellulaire de différenciation qui se rapproche le plus possible de la réalité physiologique en présence d'Epo.

L'érythropoïèse est un phénomène physiologique complexe, tant sur le plan moléculaire et cellulaire que spatial et temporel. Son bon déroulement au cours du temps fait appel à une régulation fine et précise de l'expression des gènes spécifiques du phénotype érythroïde, selon une chronologie en parfaite harmonie avec les systèmes de contrôle de la prolifération et de la mort cellulaire mais aussi de l'autophagie qui apparaît comme un phénomène crucial. Les voies de signalisation cellulaires qui conduisent au bon déroulement des différentes étapes de l'érythropoïèse sont générées par l'interaction de l'Epo avec son récepteur membranaire. Le TNF $\alpha$  active la production de céramides qui ont été décrits comme des inhibiteurs potentiels de l'érythropoïèse (Dallalio *et al.*, 1999). Le marquage des céramides par un anticorps anti-céramide et un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, confirme la capacité du TNF $\alpha$  à induire la production rapide de céramides dans nos modèles d'étude (CSPH CD34<sup>+</sup> et dans les cellules érythroleucémiques K562 et TF-1).

Nous nous sommes donc intéressés au rôle potentiel de la voie TNF $\alpha$ /SMase/céramide dans l'inhibition de l'érythropoïèse induite par l'Epo, à travers l'expression de FT et de miR spécifiques et son impact sur l'autophagie. Nous montrons ici que cette voie est impliquée dans l'inhibition de l'érythropoïèse au profit d'un engagement des cellules dans la voie granulo-monocytaire en accord avec une inhibition de l'autophagie et la modulation des FT et miR impliqués dans ces deux voies de différenciation.

## 5.1 Choix des modèles cellulaires

Les modèles cellulaires utilisés dans cette étude sont la lignée érythroleucémique humaine TF-1 et les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> isolées à partir de SCO stimulées par l'Epo ainsi que les cellules érythroleucémiques humaines K562 induites par l'anthracycline aclacinomycine (Acla).

L'Epo présente l'avantage d'être une cytokine qui va induire l'activation des voies de signalisation physiologiques contrairement aux inducteurs chimiques comme l'Acla qui peuvent agir selon des mécanismes différents (Morceau *et al.*, 1996a, Morceau *et al.*, 1996b, Jeannesson *et al.*, 1997). Cependant, l'étude de la différenciation avec des inducteurs chimiques permet de mettre en évidence, dans notre cas, l'importance de la signalisation de l'Epo dans le phénomène d'inhibition par le TNF $\alpha$ .

Les cellules CD34<sup>+</sup> sont également cultivées en présence de cytokines et de facteurs de croissance (IL-3, SCF) pour permettre leur survie et leur prolifération ainsi que l'induction de l'érythropoïèse, ce qui en fait un modèle plus physiologique mais plus complexe pour étudier et isoler l'effet d'une autre cytokine comme le TNF $\alpha$ . De plus, le SCF inhibe la production de céramides (Maddens *et al.*, 2002). Dans le cas des cellules TF-1, l'IL-3 et le SCF ne sont pas nécessaires car l'Epo est capable d'assurer leur croissance, leur survie et leur différenciation érythroïde. La population cellulaire reste donc homogène, permettant ainsi d'isoler le signal induit par le TNF $\alpha$ . Cependant, les cellules TF-1 sont des cellules de leucémie myéloïde aiguë (type érythroleucémie LAM6) et les cellules K562 sont des cellules de leucémie myéloïde chronique qui possèdent la protéine de fusion Bcr-Abl. L'oncoprotéine de fusion entraîne l'activation constitutive de la transcription de nombreux gènes pouvant modifier le développement érythroïde normal (Brozik *et al.*, 2006, Jacquel *et al.*, 2007). Ces cellules, lorsqu'elles sont induites par l'Epo ou l'Acla sont capables d'exprimer certains marqueurs érythroïdes comme les globines ou GATA-1 mais ne sont pas capables de réaliser la différenciation terminale du point de vue morphologique et fonctionnel. De plus, les cellules K562 n'expriment pas la globine  $\beta$  (Blom van Assendelft *et al.*, 1989). Les différences observées concernant les mécanismes d'inhibition du TNF $\alpha$  sur la différenciation érythroïde dans les cellules TF-1, K562 et les CSPH CD34<sup>+</sup> peuvent donc s'expliquer par le caractère cancéreux des cellules TF-1 et K562. Ainsi, on peut observer une diminution de l'expression de GATA-1 en réponse au TNF $\alpha$  dans les lignées alors que son expression est augmentée dans les CSPH CD34<sup>+</sup>.

Le marqueur membranaire CD34 est exprimé à la surface des CSPH permettant ainsi leur isolement par tri magnétique. Il disparaît au cours de la différenciation cellulaire mais il est encore présent à la surface des progéniteurs communs multipotents (Stella *et al.*, 1995). Les cellules CD34<sup>+</sup> récupérées après l'isolement et après plusieurs jours de culture constituent donc une population hétérogène.

Cependant, les résultats obtenus montrent que l'Epo induit plus de 80% de cellules érythroblastiques après 9 jours de traitement démontrant ainsi le potentiel érythroïde de la majorité des cellules isolées. De plus, le potentiel de différenciation des cellules TF-1 et K562 dans les différentes voies de l'hématopoïèse se limite à la différenciation érythroïde, mégacaryocytaire et macrophage-like (Papayannopoulou *et al.*, 1988, Murate *et al.*, 1993, Testa *et al.*, 1998) contrairement aux CSPH CD34<sup>+</sup> qui constituent un meilleur modèle pour l'étude simultanée des différentes voies de différenciation de l'hématopoïèse et d'un switch éventuel. Cependant, ce modèle ne permet pas de reproduire complètement l'environnement des CSPH tel qu'il est au sein de la niche hématopoïétique puisque celle-ci comprend différents types cellulaires, cytokines et facteurs de croissance pouvant également être impliqués dans le développement d'anémies (Gomes *et al.*, 2016).

## **5.2 La voie TNF $\alpha$ /sphingomyélinase neutre/céramides inhibe l'érythropoïèse induite par l'érythropoïétine**

Les sphingolipides sont des lipides dérivés de la sphingosine, présents notamment au niveau des membranes plasmiques des eucaryotes. De nombreuses études ont montré que les différents métabolites, particulièrement les céramides et la SIP, peuvent agir comme molécules de signalisation impliquées dans de nombreux processus cellulaires comme l'immunité, la réponse inflammatoire et les maladies inflammatoires (Maceyka *et al.*, 2014). Le TNF $\alpha$  induit la production de céramides en activant les SMases (Wiegmann *et al.*, 1994). Les travaux de Dallalio *et al.*, ont suggéré l'implication des céramides dans l'inhibition de l'érythropoïèse par l'IFN $\gamma$  dans des cellules sélectionnées à partir de sang périphérique (Dallalio *et al.*, 1999). De la même manière, Xu *et al.*, ont montré que le TNF $\alpha$  et les céramides sont capables d'inhiber la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en adipocytes (Xu *et al.*, 2010a).

L'utilisation des céramides de synthèse C2 (C2-cer) montre que les céramides exogènes sont capables d'inhiber l'érythropoïèse induite par l'Epo avec la même efficacité que le TNF $\alpha$  comme le prouvent notamment la réduction de la population cellulaire la plus différenciée (GPA<sup>bright</sup> et hémoglobinisée), ainsi que l'inhibition de l'expression des ARNm des chaînes de globines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , de l'EpoR et des miR-144 et 451 dans les CSPH CD34<sup>+</sup>. Ces résultats sont confirmés dans les cellules TF-1 et K562. En revanche, les DH qui sont des précurseurs des céramides issus de la voie *de novo*, semblent affecter la production d'Hb ainsi que la viabilité cellulaire des lignées érythroleucémiques K562 et TF-1 alors qu'ils n'ont pas d'effet sur les CSPH. Ceci témoigne d'un rôle probablement différent des DH entre les cellules saines et les cellules cancéreuses. Provoquer l'accumulation de DH *via* l'inhibition de la dihydrocéramide désaturase est d'ailleurs une stratégie thérapeutique pour induire la mort des cellules cancéreuses (Rahmaniyan *et al.*, 2011, Shibina *et al.*,



2013, Mittal *et al.*, 2014). Si les C2-cer exogènes nous ont permis de montrer un effet sur l'érythropoïèse, il est important de noter qu'ils diffèrent des céramides endogènes par leur chaîne carbonée plus courte et leur métabolisation. D'où l'importance d'induire la production de céramides endogènes dans les CSPH CD34<sup>+</sup>, les cellules K562 et TF-1 à l'aide d'une SMase bactérienne afin de confirmer l'effet des céramides sur l'érythropoïèse. Nous avons choisi la SMase de *Staphylococcus aureus* car elle est considérée comme une enzyme à activité nSMase. Cependant, cette phospholipase peut également affecter de manière moins spécifique d'autres lipides membranaires comme la phosphatidylcholine (Milhas *et al.*, 2010). Le traitement des CSPH CD34<sup>+</sup> et des TF-1 stimulées par l'Epo avec de la bSMase a permis de réduire le pourcentage de cellules positives à la benzidine du même ordre que le TNF $\alpha$  ainsi que l'expression des globines  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , et de l'EpoR. De plus, le test clonogénique confirme la diminution du nombre de colonies érythroïdes dans les cellules traitées aux C2-cer et à la bSMase. De la même manière, Takagishi *et al.*, ont montré que la toxine  $\alpha$  de *Clostridium perfringens*, qui possède une activité SMase, inhibe la différenciation érythroïde de CSH de souris (Takagishi *et al.*, 2017). Cependant, contrairement aux cellules CSPH et TF1 induites par l'Epo, la bSMase n'a aucun effet sur les cellules K562 induites par l'Acla suggérant que l'inhibition de l'érythropoïèse par les céramides endogènes pourrait interférer avec les voies de signalisation induites par l'Epo.

Les résultats obtenus par coloration de MGG montrent la formation de cellules érythroïdes matures après 9 jours de traitement à l'Epo alors que dans les cellules traitées au TNF $\alpha$ , aux C2-cer et à la bSMase, on constate la présence d'érythroblastes basophiles et une absence de cellules atteignant les stades plus matures de différenciation. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'analyse de l'expression de la GPA par cytométrie de flux qui montrent que le TNF $\alpha$  et les céramides empêchent la formation de la population la plus différenciée. De la même manière, le maintien de l'expression de GATA-1 dans les CSPH CD34<sup>+</sup> traitées par les céramides ou le TNF $\alpha$ , est en accord avec un arrêt de l'érythropoïèse puisque Whyatt *et al.*, ont montré qu'une surexpression du facteur GATA-1 entraîne un blocage des cellules au stade érythroblaste basophile conduisant à une anémie chez la souris (Whyatt *et al.*, 2000).

Les céramides et la S1P jouent des rôles opposés dans de nombreux processus cellulaires formant le « rhéostat des sphingolipides » (Newton *et al.*, 2015). Ces résultats sont confirmés ici dans le cadre de l'érythropoïèse où, contrairement aux céramides, la S1P n'a pas d'effet inhibiteur sur la production d'Hb ni sur l'expression des globines et de l'EpoR. Au contraire, les résultats indiquent que la S1P est capable d'empêcher l'effet inhibiteur du TNF $\alpha$  sur l'expression de ces marqueurs érythroïdes. En accord avec cet effet, Xu *et al.*, ont montré une augmentation de la formation de S1P au cours de la différenciation érythroïde des cellules K562 induites par la 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine (Xu *et al.*, 2010b). De plus, une augmentation de l'expression de la

SphK1 a été observée au cours de l'induction de l'érythropoïèse en accord avec une augmentation de la production de S1P (Kingsley *et al.*, 2013). Cependant, l'expression de la SphK1 est diminuée au cours de la différenciation des cellules murines Friends induites par l'hexaméthylène bisacétamide (HMBA) (Mizutani *et al.*, 2013). Dans cette étude, nous avons mis en évidence que le TNF $\alpha$  est capable d'inhiber l'expression de l'ARNm et de la protéine SphK1. Ceci est en accord avec une perturbation de l'érythropoïèse puisque Xiong *et al.*, ont montré que des embryons de souris *knock-out* pour les SphK 1 et 2 présentent des anémies (Xiong *et al.*, 2014).

Les céramides sont transformés en sphingosine puis en S1P par l'action de la CDase et de la SphK, respectivement. L'inhibition de la SphK peut conduire à une accumulation de sphingosine ou de céramides. Ces deux espèces sont donc potentiellement impliquées dans l'inhibition de l'érythropoïèse. Cependant, l'implication de la sphingosine est exclue grâce à l'utilisation des C2-cer. En effet, les céramides à courte chaîne carbonée ne peuvent pas être métabolisés par la CDase (Airola *et al.*, 2015) et nos résultats montrent qu'ils sont capables d'inhiber l'érythropoïèse. Ainsi, l'ensemble des résultats est en faveur d'un rôle inhibiteur des céramides sur l'érythropoïèse.

Nous avons étudié l'implication des céramides dans l'inhibition de l'érythropoïèse par le TNF $\alpha$ , notamment grâce à l'utilisation des inhibiteurs chimiques de SMases. Le taux élevé de mortalité des CSPH CD34<sup>+</sup> chez des cellules transfectées pendant plus de 24h a proscrit l'utilisation de siARN ciblant spécifiquement les SMases. En effet, cette technique est incompatible avec l'étude de la différenciation qui nécessite des traitements de plusieurs jours. Il existe 3 types de SMases, la alkSMase, la nSMase et la aSMase. La alkSMase a été exclue de l'étude car elle n'est localisée qu'au niveau de la bile et de l'intestin (Duan *et al.*, 1996, Nyberg *et al.*, 1996). Le GW4869 est un inhibiteur non compétitif de la nSMase capable d'empêcher l'activation de la nSMase par le TNF $\alpha$  (Luberto *et al.*, 2002). La désipramine est un inhibiteur de l'aSMase qui empêche sa liaison avec la membrane lysosomale ce qui conduit à sa dégradation par les enzymes lysosomales (Kolzer *et al.*, 2004).

L'utilisation du GW4869 en cotraitement avec le TNF $\alpha$  a permis de restaurer la formation de cellules érythroïdes matures comme observé par coloration MGG ainsi que le nombre de colonies érythroïdes mis en évidence par le test clonogénique. De plus, le GW4869 permet de réduire d'environ 50% l'effet inhibiteur de la cytokine sur la production d'Hb dans les CSPH CD34<sup>+</sup> et les TF-1 et de restaurer l'expression des globines et de l'EpoR. Ces résultats montrent l'implication de la nSMase dans l'inhibition de l'érythropoïèse induite par le TNF $\alpha$ . De manière intéressante, la mithramycine, un inducteur connu de l'érythropoïèse, inhibe l'expression de la nSMase *via* l'inhibition des facteurs sp1 et sp3 nécessaires à sa transcription (Clarke *et al.*, 2016). Cependant à l'échelle d'un organisme entier, une inhibition de la nSMase entraîne une ostéogénèse imparfaite

chez la souris (Aubin *et al.*, 2005). L'inhibiteur de l'aSMase, la désipramine, a un potentiel inhibiteur de l'érythropoïèse. De plus, la désipramine n'est pas capable d'empêcher l'effet inhibiteur du TNF $\alpha$  sur la formation de cellules érythroïdes matures (MGG), de colonies érythroïdes ainsi que sur l'expression des globines. De plus, son utilisation seule est capable de diminuer l'expression des globines. Les rôles différents des deux types de SMases a également été mis en évidence dans la réponse des astrocytes au TNF $\alpha$  (Gu *et al.*, 2013).

Les céramides et la S1P sont des régulateurs clés de l'apoptose et de la survie cellulaire. Les céramides ont un rôle pro-apoptotique dans de nombreux modèles cellulaires contrairement à la S1P qui a un effet anti-apoptotique (Obeid *et al.*, 1993, Cuvillier *et al.*, 1996, Morad *et al.*, 2013). De plus, les céramides jouent un rôle essentiel dans la mort des érythrocytes par éryptose, une mort caractérisée par une contraction des érythrocytes, l'exposition de phosphatidylsérine et une entrée de calcium (Pretorius *et al.*, 2016).

Cependant, l'analyse de la viabilité cellulaire par un test d'exclusion au bleu de Trypan confirmé par un double marquage à l'Annexin V/iodure de propidium montre que dans les cellules stimulées à l'Epo, le TNF $\alpha$  et les céramides n'induisent pas d'apoptose ce qui suggère que l'inhibition de l'érythropoïèse dans les CSPH CD34<sup>+</sup> est indépendante d'un effet sur la viabilité cellulaire. L'induction de Bcl-xL par l'Epo pourrait être responsable de la survie des cellules dans notre modèle étant donné qu'une surexpression de Bcl-xL est capable d'empêcher l'induction de l'apoptose par les céramides (El-Assaad *et al.*, 1998). De la même manière, l'inhibition de la différenciation érythroïde par la toxine  $\alpha$  de *Clostridium perfringens* qui possède une activité SMase, n'est pas due à un effet des céramides sur la viabilité cellulaire (Takagishi *et al.*, 2017). De plus, les C2-cer sont capables d'induire la survie de fibroblastes en induisant NF- $\kappa$ B et la transcription des gènes impliqués dans la survie *via* l'activation des calpaïnes (Demarchi *et al.*, 2005). Le rôle des céramides dans la survie cellulaire a également été mis en évidence dans des neurones sympathiques (Song *et al.*, 2003, Plummer *et al.*, 2005). De manière intéressante, nous montrons que, bien que l'Epo n'exerce plus son rôle d'inducteur de l'érythropoïèse en présence du TNF $\alpha$  et des céramides, les cellules restent viables.

### **5.3 Les céramides et le TNF $\alpha$ induisent la granulopoïèse aux dépens de l'érythropoïèse *via* la modulation de miR et FT hématopoïétiques**

Malgré l'absence de maturation érythroïde des CSPH stimulées à l'Epo en présence du TNF $\alpha$  et des céramides, les cellules restent viables. Nous avons donc élargi notre étude à l'effet de la voie TNF $\alpha$ /nSMase/céramide sur d'autres voies de l'hématopoïèse. Les résultats des coloration MGG, des tests clonogéniques et de l'analyse de l'expression du marqueur granulo-monocytaire CD11b

montrent clairement que le TNF $\alpha$  et les céramides induisent la myélopoïèse dans les CSPH CD34<sup>+</sup> traitées à l'Epo. Le potentiel des céramides en tant qu'inducteurs de la différenciation myéloïde a été montré dans des lignées cellulaires déjà engagées. En effet, Okazaki *et al.*, ont montré que la vitamine D induit la différenciation des cellules promyélocytaires HL60 en corrélation avec une augmentation de l'activité nSMase et la production de céramides indépendamment de la formation de sphingosine (Okazaki *et al.*, 1989, Okazaki *et al.*, 1990). De la même manière, Kim *et al.*, ont suggéré l'implication de la voie SMase/céramide dans l'induction de la différenciation monocyttaire des cellules HL60 par le TNF $\alpha$  (Kim *et al.*, 1991).

Il a été montré que l'inflammation altère l'hématopoïèse en favorisant la myélopoïèse et notamment la granulopoïèse au détriment des autres voies de différenciation (Ueda *et al.*, 2005). Comme le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  est également capable d'inhiber l'érythropoïèse (Means *et al.*, 1992). Pietras *et al.*, ont montré qu'une exposition chronique des CSH à l'IL-1 $\beta$  conduit à une augmentation du nombre de cellules myéloïdes, à une anémie ainsi qu'à une perte de la production de lymphocytes naïfs *via* une activation des gènes régulés par le facteur PU.1 (Pietras *et al.*, 2016). De même, l'INF $\gamma$  inhibe l'érythropoïèse et est capable d'induire la monocyttopoïèse *via* une augmentation de PU.1 (de Bruin *et al.*, 2014). De plus, nos résultats, confirmés par l'analyse des cellules par MET montrent que le TNF $\alpha$  et la bSMase induisent préférentiellement la formation de cellules granulocytaires qui présentent un noyau plurilobé ainsi que des granules et des vésicules de sécrétion. La différence entre l'effet du TNF $\alpha$ , qui induit la formation de populations monocytaires et granulocytaires, et l'effet de la bSMase, qui induit uniquement la formation d'une population granulocytaire peut s'expliquer par l'effet cytotoxique de la bSMase pour les monocytes mais qui n'affecte pas la viabilité des granulocytes (Walev *et al.*, 1996).

Les facteurs de transcription GATA-1 et PU.1 sont des facteurs essentiels à l'hématopoïèse. La prédominance ou l'absence de l'un de ces facteurs est déterminante pour l'engagement des cellules dans les différentes voies de différenciation (Iwasaki *et al.*, 2007). En effet, l'utilisation de siARN ciblant PU.1 dans des monocytes diminue l'expression du marqueur monocyttaire CD14 et augmente l'expression des gènes de globines régulés par GATA-1 (Nouri *et al.*, 2016). De la même manière, une expression ectopique de GATA-1 dans les monocytes inhibe l'expression des marqueurs monocytaires (Visvader *et al.*, 1992, Kulesa *et al.*, 1995). Nos résultats montrent que l'induction de la différenciation granulocytaire par le TNF $\alpha$ , la bSMase et les C2-céramides s'accompagne d'une surexpression de PU.1. Ces résultats sont en accord avec l'augmentation de l'expression du facteur PU.1 au cours de la différenciation granulocytaire des cellules CD34<sup>+</sup> (Chen *et al.*, 1995). De plus, PU.1 interagit avec le facteur GATA-1 et inhibe ainsi son activité transcriptionnelle conduisant à une inhibition de l'érythropoïèse (Zhang *et al.*, 2000, Stopka *et al.*,

2005). Les résultats obtenus montrent que le TNF $\alpha$  et les céramides induisent également l'expression de GATA-1 en accord avec les résultats de Whyatt *et al.*, qui montrent qu'une surexpression de GATA-1 dans des cellules érythroïdes de souris conduit à une anémie (Whyatt *et al.*, 2000). De plus, les travaux précédemment réalisés au laboratoire ont montré que le TNF $\alpha$  induit l'interaction PU.1/GATA1 dans les CSPH CD34<sup>+</sup> en accord avec une inhibition des gènes cibles de GATA-1 (Grigorakaki *et al.*, 2011). L'interaction GATA-1/PU.1 est également retrouvée dans le cadre d'une inhibition de l'érythropoïèse par l'acide valproïque (Trecul *et al.*, 2014). De manière intéressante, la transcription des gènes régulés par GATA-1 comme celui de SphK1 (Muntean *et al.*, 2005), des miR-144/451 et des gènes érythroïdes en général (globines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , EpoR et GPA), est inhibée par le TNF $\alpha$  et les céramides, en accord avec une inhibition de l'activité de GATA-1. L'augmentation de l'expression de GATA-1 en dépit de l'inhibition de son activité peut s'expliquer par la modulation du facteur GATA-2, car les deux facteurs se régulent mutuellement. En effet GATA-2 régule positivement la transcription du gène GATA-1 dans les CSPH, ce qui est en accord avec l'augmentation de l'expression de GATA-1 dans notre modèle (Ikonomi *et al.*, 2000b). En revanche, l'expression du gène GATA-2 est normalement réprimée par l'augmentation de GATA-1, ce qui entraîne un épuisement de GATA-2 dans les cellules érythroïdes (Ikonomi *et al.*, 2000a). L'augmentation de l'expression de GATA-2 va donc également dans le sens d'une inhibition de l'activité de GATA-1, en réponse au TNF $\alpha$  et à la nSMase. De plus, il a été démontré qu'une surexpression de GATA-2 entraîne l'inhibition de l'érythropoïèse (Ikonomi *et al.*, 2000b). Dans notre modèle, la balance GATA-1/GATA-2 est donc perturbée et affecte l'érythropoïèse. D'autre part, la surexpression de GATA-1 peut résulter d'une protection de la protéine GATA-1 contre sa dégradation par hsp70 dans les cellules traitées par le TNF $\alpha$  (Ribeil *et al.*, 2007). De manière intéressante, l'inhibiteur de la nSMase, le GW4869, n'a pas d'effet sur l'expression de GATA-1 mais est capable d'empêcher l'induction de l'expression des deux facteurs inhibiteurs de l'érythropoïèse PU.1 et GATA-2 par le TNF $\alpha$ . La co-expression des facteurs GATA-1, PU.1 et GATA-2 est généralement retrouvée dans les mastocytes (Takemoto *et al.*, 2010). Cependant, l'observation des cellules après coloration de MGG et par MET ne montre aucun mastocyte dans les cellules traitées au TNF $\alpha$  et aux céramides. De plus, Sugiyama *et al.*, ont montré qu'une surexpression de FOG-1 dans les stades de progéniteurs mastocytaires favorise le développement granulocytaire malgré la présence de GATA-1, GATA-2 et PU.1 (Sugiyama *et al.*, 2008).

Les microARN sont également des régulateurs importants de l'hématopoïèse qui agissent en harmonie avec les facteurs de transcription pour l'engagement dans les différentes voies de différenciation. C'est le cas des miR-144 et 451, régulés par GATA-1, qui sont essentiels à l'érythropoïèse (Dore *et al.*, 2008, Kouhkan *et al.*, 2013). Les résultats obtenus montrent que le TNF $\alpha$  et les céramides diminuent l'expression de ces deux miR. L'inhibiteur de la nSMase prévient

cet effet en accord avec l'inhibition de l'activité de GATA-1 et de l'érythropoïèse par la voie TNF $\alpha$ /nSMase/céramide. De plus, le miR-451 est capable d'inhiber l'activité de NF- $\kappa$ B et de ce fait l'expression des protéines pro-inflammatoires associées (Sun *et al.*, 2016). Le facteur PU.1, en collaboration avec NF- $\kappa$ B, est quant à lui inducteur des miR-155 et 146a impliqués dans le développement monocyttaire (Taganov *et al.*, 2006, O'Connell *et al.*, 2007, Ghani *et al.*, 2011). Une surexpression du miR-146a dans des CSH transplantées chez la souris entraîne une diminution de l'érythropoïèse, une expansion des cellules myéloïdes ainsi qu'une inhibition de la lymphopoïèse (Starczynowski *et al.*, 2011). Nos résultats montrent que l'expression des miR-155 et 146a est augmentée en réponse au TNF $\alpha$  après 24h et 96h de traitement respectivement. Ces miR inhibiteurs de l'érythropoïèse et inducteurs de la monocyttopoïèse sont exprimés successivement au cours du développement en accord avec l'induction de la monocyttopoïèse par le TNF $\alpha$  (Masaki *et al.*, 2007, Starczynowski *et al.*, 2011, Squadrito *et al.*, 2013). De plus, le récepteur de la S1P (S1PR1) est une cible du miR-155 (Xin *et al.*, 2015). L'augmentation de l'expression du miR-155 à 24h dans les cellules traitées au TNF $\alpha$  constitue un argument supplémentaire en faveur de l'absence d'action de la S1P et donc un effet inhibiteur sur l'érythropoïèse. Cependant, les céramides n'affectent pas l'expression de ces miR. Ceci est toutefois en corrélation avec l'induction de la formation majoritaire de granulocytes par les céramides dans notre modèle. En effet, au cours de la granulopoïèse les miR-155 et 146a sont exprimés aux stades myéloblaste et promyélocyte mais leur expression diminue au cours de la différenciation (Larsen *et al.*, 2013). En revanche, l'expression du miR-223 est augmentée dans les cellules traitées au TNF $\alpha$  et aux céramides et le GW4869 est capable d'empêcher cette induction par le TNF $\alpha$ . Le miR-223 est également régulé par PU.1 mais aussi par les facteurs CEBP (Fukao *et al.*, 2007). Il a été démontré qu'une surexpression du miR-223 dans les CSH augmente la granulopoïèse et inhibe la différenciation érythroïde et mono/macrophagique en accord avec les résultats obtenus (Vian *et al.*, 2014).

L'expression d'autres miR impliqués dans l'érythropoïèse a été analysée dans les cellules traitées au TNF $\alpha$ . En accord avec son effet inducteur de l'érythropoïèse, on peut observer une augmentation progressive de l'expression du miR-486 en fonction du temps dans les cellules traitées à l'Epo (Wang *et al.*, 2015a). De la même manière, l'expression du miR-221 qui a un effet inhibiteur sur l'érythropoïèse diminue (Felli *et al.*, 2005). Cependant, le TNF $\alpha$  n'affecte pas l'expression de ces deux miR. De plus, on peut observer une augmentation transitoire de l'expression des miR-15a, 126 et 23a inhibiteurs de l'érythropoïèse après 24h de traitement au TNF $\alpha$  (Zhao *et al.*, 2009, Grabher *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2015b). Paradoxalement, le miR-16 qui est un inducteur de l'érythropoïèse, est surexprimé en réponse au TNF $\alpha$  mais il a été montré que l'expression de ce miR augmente également au cours de la différenciation neutrophile (Bissels *et al.*, 2012, Palma *et al.*, 2012).

L'ensemble des résultats démontrent que l'inhibition de l'érythropoïèse par la voie TNF $\alpha$ /nSMase/céramide est concomitante à une induction de la différenciation myéloïde faisant intervenir les régulateurs clés (FT et miR) impliqués dans la détermination de l'engagement des cellules vers l'une ou l'autre voie de différenciation.

Ainsi, nous montrons que le TNF $\alpha$  et les céramides permettent une différenciation rapide des CSPH isolées à partir de SCO en cellules myéloïdes *in vitro*. De manière intéressante, nous montrons également que l'inhibiteur de l'aSMase, la désipramine, induit la myélopoïèse des CSPH CD34<sup>+</sup> stimulées à l'Epo. Dans le cas des greffes de CSH isolées à partir de SCO, la désipramine, qui est déjà utilisée comme médicament (antidépresseur), pourrait donc être une alternative pour faciliter la reconstitution immunitaire et limiter la période d'aplasie et les effets associés. En effet, le SCO est une source intéressante pour les greffes de CSH car il présente de nombreux avantages par rapport aux CSH de la moelle osseuse ou mobilisées à partir de sang périphérique. De plus, ces cellules ont une immunogénicité plus faible qui permet d'atténuer l'effet greffon *versus* hôte (GvH), une cause importante d'échec. Cependant, les transplantations de CSH isolées à partir de SCO nécessitent plus de temps pour parvenir à la repopulation de la moelle et entraînent une faible reconstitution immunitaire et un taux d'infection élevé en comparaison avec les patients transplantés avec les autres sources de CSH (Danby *et al.*, 2014). Le SCO contient en effet moins de cellules nucléées ce qui allonge le temps de reconstitution des neutrophiles (Seggewiss *et al.*, 2010). La désipramine pourrait donc potentiellement accélérer la repopulation en stimulant la myélopoïèse des CSH issues de SCO. Dans le cadre du myélome multiple, un essai clinique concernant la stimulation de l'activité adrénergique pour la mobilisation des CSH dans le sang périphérique par la combinaison désipramine/G-CSF est en cours. Il sera intéressant par la suite, de suivre cette étude et notamment les résultats portant sur le temps de reconstitution de la population neutrophile.

#### **5.4 Le TNF $\alpha$ et les céramides inhibent l'autophagie *via* l'activation de mTOR**

L'autophagie est un phénomène essentiel pour l'élimination des organites cellulaires au cours de l'érythropoïèse. En revanche, bien que l'autophagie joue un rôle dans la fonction des granulocytes matures (Bhattacharya *et al.*, 2015), Rozman *et al.*, ont montré que l'autophagie n'est pas indispensable à la différenciation granulocytaire (Rozman *et al.*, 2015) et une autophagie excessive dans les précurseurs myéloïdes est même associée à une neutropénie chez des patients carencés en vitamine B12 et folates (Wickramasinghe *et al.*, 1977). Nous nous sommes donc intéressés à l'impact du TNF $\alpha$  et des céramides sur l'autophagie associée au développement érythroïde des CSPH CD34<sup>+</sup>. Le TNF $\alpha$  est généralement considéré comme un inducteur de l'autophagie (Lapaquette *et al.*, 2015). Les sphingolipides jouent également un rôle important dans la régulation

de l'autophagie (Young *et al.*, 2013) et, comme le TNF $\alpha$ , les céramides ont souvent un effet inducteur car ils peuvent interagir avec LC3-II afin de cibler spécifiquement les mitochondries à dégrader (Sentelle *et al.*, 2012). De plus, les céramides activent la phosphatase PP2A qui inhibe AKT par déphosphorylation, empêchant l'activation de l'inhibiteur de l'autophagie mTOR (Scarlatti *et al.*, 2004). Néanmoins, un effet inhibiteur du TNF $\alpha$  et des céramides sur l'autophagie a également été montré. Les céramides sont capables d'activer la voie mTOR indépendamment d'AKT (Leseux *et al.*, 2008) et la PP2A peut également jouer un rôle inhibiteur de l'autophagie (Yorimitsu *et al.*, 2009). L'effet inhibiteur du TNF $\alpha$  sur l'autophagie a été décrit dans des cellules neuronales ou de cancer colorectal (Wang *et al.*, 2015b, Zhang *et al.*, 2017). Nos résultats de MET, de microscopie à fluorescence après transfection d'un plasmide GFP-LC3, l'accumulation de SQSTM1/p62 ainsi que l'étude de la voie inhibitrice de l'autophagie PI3K/AKT/mTOR vont dans le sens d'un impact négatif du TNF $\alpha$  et des céramides sur l'autophagie dans notre modèle. Cet effet inhibiteur du TNF $\alpha$  et des céramides sur l'autophagie dans notre modèle est en accord avec l'inhibition de l'érythroïèse qui conduit à des anémies (Mortensen *et al.*, 2010). De plus, nous avons montré que la S1P est capable de restaurer l'érythroïèse inhibée par le TNF $\alpha$  alors que l'inhibiteur de la SphK1, le PF-543 inhibe l'érythroïèse. Ces résultats sont en accord avec Young *et al.*, qui ont montré que l'inhibition de la SphK1 conduit à une inhibition de l'autophagie associée à une inhibition du trafic endosomal (Young *et al.*, 2016).

L'analyse des structures cellulaires par MET a permis d'identifier de nombreux autolysosomes à maturité variable caractéristiques d'une activité autophagique avancée dans les cellules traitées par l'Epo seule, mais pas dans les cellules co-traitées avec le TNF $\alpha$  ou la bSMase. En effet, les images montrent clairement une disparition des vésicules autophagiques dans ces cellules. Par ailleurs, ces cellules présentent un noyau plurilobé ainsi que des granules et vésicules de sécrétion caractéristiques des polynucléaires neutrophiles en accord avec les résultats obtenus par l'analyse du marqueur CD11b, les MGG ainsi que le test clonogénique. De plus, les résultats montrent l'implication de la voie nSMase/céramide dans l'inhibition de l'autophagie par le TNF $\alpha$ . En effet, le GW4869 est capable d'empêcher l'effet inhibiteur du TNF $\alpha$  sur la formation de vésicules autophagiques. De manière intéressante, la nSMase joue aussi un rôle dans la libération d'exosomes à partir des corps multivésiculaires du système endosomal. Son inhibition par le GW4869 empêche donc le relargage des exosomes dans le milieu extracellulaire (Guo *et al.*, 2015). Or, si la voie endosomale est bloquée, la voie de l'autophagie est favorisée car les corps multivésiculaires qui ne peuvent plus relarguer les exosomes vont fusionner avec les autophagosomes pour former des amphisomes. Des corps multivésiculaires fonctionnels sont donc nécessaires pour une autophagie efficace (Filimonenko *et al.*, 2007). De plus, une induction de l'autophagie ou une surexpression de



LC3 inhibe le relargage d'exosomes dans le cadre de la maturation érythroïde (Fader *et al.*, 2005, Fader *et al.*, 2008, Amaya *et al.*, 2015).

L'inhibition de l'autophagie par le TNF $\alpha$  et les céramides est confirmée par l'analyse de la formation de *punctae* dans les cellules transfectées avec un plasmide GFP-LC3. En comparaison avec les cellules traitées à l'Epo qui présentent des *punctae* GFP-LC3 caractéristiques de l'autophagie, la distribution de LC3 est diffuse dans les cellules traitées au TNF $\alpha$  et aux céramides. Le GW4869 confirme sa capacité de restaurer la formation de *punctae* dans les cellules traitées au TNF $\alpha$ . L'analyse de la conversion de LC3 par Western blot est une méthode classiquement utilisée pour l'étude de l'activité autophagique des cellules. Les Western blots réalisés ont révélé une accumulation équivalente de la forme LC3-II dans les cellules traitées à l'Epo et dans celles traitées au TNF $\alpha$ , ne permettant pas de confirmer l'effet inhibiteur du TNF $\alpha$ . Il a été montré que l'augmentation de la forme LC3-II ne permet pas de conclure à une induction ou une inhibition de l'autophagie (Klionsky *et al.*, 2016). De plus, LC3-II peut être retrouvé dans des phénomènes « non-autophagiques » comme au niveau des vésicules de sécrétion par exemple (Ushio *et al.*, 2011, Subramani *et al.*, 2013). Afin de confirmer l'effet inhibiteur du TNF $\alpha$  et des céramides sur l'autophagie, nous avons étudié un autre marqueur de l'autophagie, la protéine SQSTM1/p62 qui est dégradée avec le contenu des autolysosomes mais qui s'accumule dans le cas d'une inhibition de l'autophagie (Katsuragi *et al.*, 2015). La transcription du gène SQSTM1/p62 est régulée NF- $\kappa$ B ou des facteurs de la famille ETS tel que PU.1 (Vadlamudi *et al.*, 1998). L'accumulation de SQSTM1/p62 observée dans les cellules traitées au TNF $\alpha$  et à la bSMase est en accord avec une inhibition de l'autophagie. Ces résultats sont également en conformité avec l'induction de la granulopoïèse et du facteur PU.1 car l'expression de SQSTM1/p62 est augmentée au cours de la différenciation granulocytaire (Trocoli *et al.*, 2014).

L'étude des protéines impliquées dans l'induction de l'autophagie montre que le TNF $\alpha$  active la voie inhibitrice de l'autophagie PI3K<sup>Y458</sup>/AKT<sup>S473</sup>/mTOR<sup>S2448</sup>. Ces résultats sont à la fois en accord avec une inhibition de l'autophagie et une induction de la différenciation myéloïde (Martelli *et al.*, 2010). En effet, AKT est capable de phosphoryler le facteur myéloïde PU.1 et d'augmenter son activité transcriptionnelle (Rieske *et al.*, 2001). De plus, une surexpression d'AKT dans des cellules CD34<sup>+</sup> de souris induit le développement monocyttaire et neutrophile alors que la différenciation est inhibée avec des inhibiteurs d'AKT (Buitenhuis *et al.*, 2008). De la même manière que le TNF $\alpha$ , les céramides activent mTOR dans notre modèle mais de manière indépendante de la voie PI3K/AKT. Ces résultats sont en accord avec le rôle des céramides dans l'inhibition d'AKT (Scarlati *et al.*, 2004). Cependant, les céramides activent également PKC $\zeta$  qui peut activer mTOR de manière

indépendante d'AKT (Leseux *et al.*, 2008). De plus, Dan *et al.*, ont montré que le TNF $\alpha$  pouvait activer mTOR de manière dépendante ou indépendante d'AKT dans différents types cellulaires (Dan *et al.*, 2008). Le rôle important de mTOR dans l'inhibition de l'autophagie et de l'érythropoïèse par le TNF $\alpha$  et les céramides a été confirmé en utilisant un inhibiteur de mTOR, la rapamycine. Nos résultats montrent que la rapamycine, utilisée en co-traitement avec le TNF $\alpha$  ou les céramides, est capable non seulement d'empêcher l'inhibition de l'autophagie mais également de restaurer la différenciation érythroïde. Ensemble, ces résultats montrent que l'activation de mTOR joue un rôle important dans l'inhibition de l'autophagie et de l'érythropoïèse par le TNF $\alpha$  et les céramides. Des inhibiteurs de mTOR tels que la rapamycine ou ses dérivés comme l'everolimus sont utilisés en thérapeutique notamment en tant qu'immunosuppresseurs dans le cas de greffes d'organes (Weichhart *et al.*, 2015) et pourraient potentiellement être utilisés dans le cas d'anémies liées à l'inflammation. De plus, il a été montré que l'utilisation d'inhibiteurs de mTOR prévient l'anémie dans un modèle murin de drépanocytose (Wang *et al.*, 2016b) et améliore considérablement la maturation érythroïde chez des souris  $\beta$ -thalassémiques (Zhang *et al.*, 2014). Cependant, chez l'Homme, ces inhibiteurs de mTOR présentent de nombreux effets secondaires et notamment une anémie microcytaire qui résulterait plutôt d'une dérégulation du métabolisme du fer (Sofroniadou *et al.*, 2010, Kaplan *et al.*, 2014). L'activation de mTOR par les céramides et le TNF $\alpha$  dans notre modèle est confirmée par la présence de la phosphorylation inhibitrice de ULK1 au niveau de la sérine 758 qui rend la kinase inactive (Kim *et al.*, 2011a). De manière intéressante, les souris déficientes pour ULK1 ne sont pas capables d'éliminer correctement les mitochondries au cours de la différenciation érythroïde (Kundu *et al.*, 2008). L'inactivation de ULK1 par le TNF $\alpha$  et les céramides est confirmée par l'absence de phosphorylation de son substrat Atg13 au niveau de la sérine S355 en accord avec l'inhibition de l'autophagie. En effet, la phosphorylation d'Atg13 est nécessaire à la formation du complexe ULK1/FIP200/Atg13 essentiel pour la localisation de ULK1 au niveau de la membrane pré-autophagosomale ainsi que pour sa stabilité (Ganley *et al.*, 2009, Joo *et al.*, 2011).

L'étude d'autres protéines impliquées dans l'autophagie telles que beclin 1, Atg7 ou la formation du complexe Atg5-Atg12 est également en accord avec une inhibition de l'autophagie. En effet, l'expression de beclin 1 et du complexe Atg5-Atg12 est diminuée à des temps courts de traitement au TNF $\alpha$  et aux céramides alors que l'expression d'Atg7 n'est pas affectée par les traitements. Cependant, Zhang *et al.*, ont montré que l'élimination des mitochondries au cours de la maturation érythroïde pouvait faire intervenir des mécanismes dépendants ou indépendants d'Atg7 chez la souris (Zhang *et al.*, 2009). De plus, les résultats obtenus montrent que le TNF $\alpha$  induit une

augmentation de l'expression de la protéine rubicon inhibitrice de la fusion autophagosome/lysosome en accord avec une inhibition de l'autophagie.

D'autre part, ces résultats montrent la corrélation entre une inhibition de l'autophagie et l'induction de la myélopoïèse dans les CSPH CD34<sup>+</sup>. Ces résultats sont contradictoires avec une étude récente de Riffelmacher *et al.*, réalisée chez la souris qui montre le rôle de l'autophagie et notamment de la lipophagie dans la différenciation granulocytaire normale. Cette étude montre que la délétion d'Atg7 au niveau des précurseurs myéloïdes de souris empêche la dégradation des lipides qui permet la production d'énergie *via* la respiration mitochondriale, nécessaire à la différenciation granulocytaire. En revanche, l'absence de différenciation dans ce modèle de cellules Atg7<sup>-/-</sup>, n'est pas corrélée à un défaut d'expression du facteur de transcription granulocytaire CEBP $\alpha$ , ni des récepteurs spécifiques au G-CSF et GM-CSF, ni à la transcription des gènes codant les protéines présentes dans les granules (Riffelmacher *et al.*, 2017).

Les FT et miR sont également des régulateurs importants de l'autophagie. De manière intéressante, le facteur GATA-1 responsable de la transcription des gènes érythroïdes induit également la transcription de gènes codant les protéines impliquées dans l'autophagie telles que LC3B, GABARAPL1, GATE 16, Atg 4B ou Lamp1 dans les cellules murines G1E (Kang *et al.*, 2012). Cependant, l'étude de l'expression de ces gènes montre que les différents traitements n'ont pas d'effets sur l'expression d'Atg4B, GATE 16 et Lamp1, que le TNF $\alpha$  diminue l'expression de LC3 et de GABARAPL1, et que les céramides diminuent uniquement l'expression de GABARAPL1. Ceci suggère que dans notre modèle, d'autres mécanismes de régulation sont impliqués. Nos résultats montrent également une diminution de l'expression du miR-144 dans les cellules traitées au TNF $\alpha$  et aux céramides. Ces résultats sont en accord avec l'effet inducteur du miR-144 sur l'autophagie (Chen *et al.*, 2015). De plus, l'expression du miR-155 est augmentée en réponse au TNF $\alpha$ . D'Adamo *et al.*, ont montré l'implication du miR-155 dans l'inhibition de l'autophagie dans les chondrocytes en ciblant les ARNm de LC3, GABARAPL1, ULK1, FOXO3, Atg14, Atg5 et Atg3 (D'Adamo *et al.*, 2016). Néanmoins, l'utilisation d'un analogue du miR-155 ne permet pas de confirmer l'effet inhibiteur du miR-155 sur l'expression de ces gènes dans notre modèle.

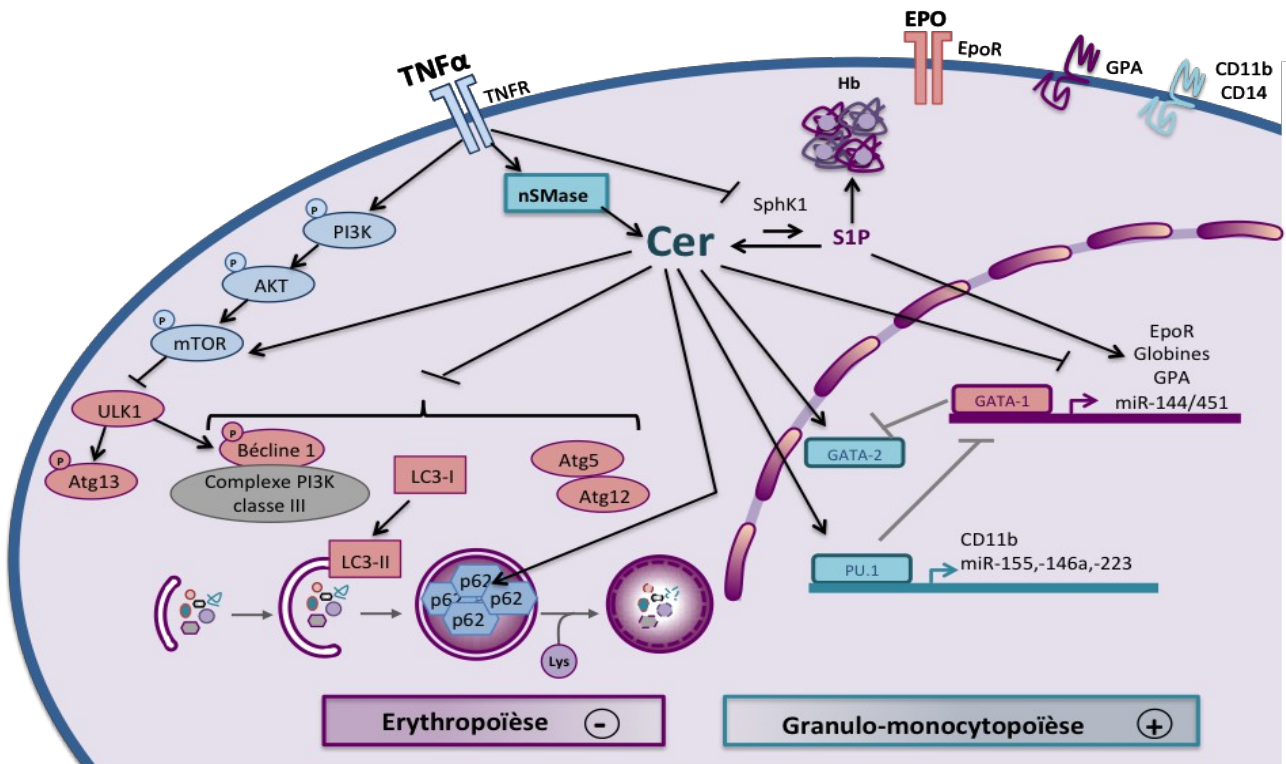
Ainsi, l'ensemble des résultats montrent que le TNF $\alpha$  et les céramides inhibent l'autophagie et l'érythropoïèse *via* l'activation de mTOR de manière dépendante ou indépendante de la voie PI3K/AKT respectivement ainsi que la modulation de l'expression de protéines impliquées dans l'autophagie.

## Conclusion et perspectives

Alors que l'action du TNF $\alpha$ , à la fois comme inhibiteur de l'érythropoïèse et activateur de la différenciation myéloïde, a pu être confirmée, l'implication des sphingolipides bioactifs dans ces effets a pu être démontrée. Les résultats obtenus avec les céramides C2 exogènes et les céramides endogènes générés par la bSMase de *S. aureus* ainsi que l'utilisation des inhibiteurs de SMases montrent que la voie TNF $\alpha$ /nSMase/céramides est impliquée dans l'inhibition de la production des globines, de l'Hb, de l'EpoR ainsi que de la GPA. De plus, la voie nSMase/céramides est impliquée dans la déstabilisation de l'équilibre GATA-1/GATA-2 ainsi que dans la modulation de certains FT clés de l'hématopoïèse tels que PU.1. Ces résultats sont en accord avec l'effet inhibiteur du TNF $\alpha$  et des céramides sur l'érythropoïèse et montrent que les cellules restent viables et ne se maintiennent pas dans un état indifférencié mais sont engagées vers la voie de différenciation granulomonocytaire. De plus, nous avons montré que le TNF $\alpha$  et les céramides bloquent l'autophagie notamment *via* mTOR de manière dépendante ou indépendante de la voie PI3K/AKT, interviennent aussi au niveau de l'élongation et la fermeture du phagophore ainsi qu'au niveau de la fusion autophagosome/lysosome en modulant l'expression de protéines nécessaires à chacune de ces étapes comme LC3, beclin 1, Atg5-Atg12 ou RUBICON. L'ensemble des résultats démontre donc que la voie nSMase/céramides entraîne une inhibition de l'autophagie impliquée dans l'effet inhibiteur du TNF $\alpha$  sur l'érythropoïèse au profit d'une activation de la granulopoïèse (Figure 64).

Afin de compléter notre étude, il serait intéressant d'approfondir le rôle de la voie TNF $\alpha$ /SMase/céramides dans l'inhibition de l'érythropoïèse et notamment de l'autophagie en analysant :

- L'effet d'inhibiteurs de différentes étapes de l'autophagie sur la différenciation hématopoïétique dans des CSPH CD34<sup>+</sup> induites par l'Epo.
- L'effet du TNF $\alpha$  et des céramides sur l'expression des cibles des céramides comme la protéine phosphatase PP2A, la PKC $\zeta$ , les cathepsines ainsi que sur la production de calcium.
- L'effet du TNF $\alpha$  et des céramides sur le transport vésiculaire, la formation et la fusion des vésicules de sécrétion en étudiant l'expression de marqueurs spécifiques comme Rab3A ou Rab27A ou les protéines SNARE
- Le contenu en miR des exosomes relargués par les cellules traitées après isolement, sachant que le GW4869 est un inhibiteur du relargage d'exosome.



**Figure 64 : Conclusion générale**

## 6 Bibliographie

Aapro, M., Jelkmann, W., Constantinescu, S. N. and Leyland-Jones, B. (2012). "Effects of erythropoietin receptors and erythropoiesis-stimulating agents on disease progression in cancer." Br J Cancer **106** (7) : 1249-1258.

Adam, D., Wiegmann, K., Adam-Klages, S., Ruff, A. and Kronke, M. (1996). "A novel cytoplasmic domain of the p55 tumor necrosis factor receptor initiates the neutral sphingomyelinase pathway." J Biol Chem **271** (24) : 14617-14622.

Adam-Klages, S., Adam, D., Wiegmann, K., Struve, S., Kolanus, W., Schneider-Mergener, J. and Kronke, M. (1996). "FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase." Cell **86** (6) : 937-947.

Adams, D. R., Pyne, S. and Pyne, N. J. (2016). "Sphingosine Kinases: Emerging Structure-Function Insights." Trends Biochem Sci **41** (5) : 395-409.

Adams, G. B., Chabner, K. T., Alley, I. R., Olson, D. P., Szczepiorkowski, Z. M., Poznansky, M. C., Kos, C. H., Pollak, M. R., Brown, E. M. and Scadden, D. T. (2006). "Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor." Nature **439** (7076) : 599-603.

Adelzadeh, L., Jourabchi, N. and Wu, J. J. (2014). "The risk of herpes zoster during biological therapy for psoriasis and other inflammatory conditions." J Eur Acad Dermatol Venereol **28** (7) : 846-852.

Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C. T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O. J., Thoren, L. A., *et al.* (2005). "Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment." Cell **121** (2) : 295-306.

Aebersold, D. M., Burri, P., Beer, K. T., Laissue, J., Djonov, V., Greiner, R. H. and Semenza, G. L. (2001). "Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer." Cancer Res **61** (7) : 2911-2916.

Airola, M. V., Allen, W. J., Pulkoski-Gross, M. J., Obeid, L. M., Rizzo, R. C. and Hannun, Y. A. (2015). "Structural Basis for Ceramide Recognition and Hydrolysis by Human Neutral Ceramidase." Structure **23** (8) : 1482-1491.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. and Weissman, I. L. (2000). "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." Nature **404** (6774) : 193-197.

- Alemu, E. A., Lamark, T., Torgersen, K. M., Birgisdottir, A. B., Larsen, K. B., Jain, A., Olsvik, H., Overvatn, A., Kirkin, V. and Johansen, T. (2012). "ATG8 family proteins act as scaffolds for assembly of the ULK complex: sequence requirements for LC3-interacting region (LIR) motifs." J Biol Chem **287** (47) : 39275-39290.
- Alers, S., Loffler, A. S., Wesselborg, S. and Stork, B. (2012). "Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks." Mol Cell Biol **32** (1) : 2-11.
- Alvarez, S. E., Milstien, S. and Spiegel, S. (2007). "Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate." Trends Endocrinol Metab **18** (8) : 300-307.
- Amaya, C., Fader, C. M. and Colombo, M. I. (2015). "Autophagy and proteins involved in vesicular trafficking." FEBS Lett **589** (22) : 3343-3353.
- Andrieu-Abadie, N., Gouaze, V., Salvayre, R. and Levade, T. (2001). "Ceramide in apoptosis signaling: relationship with oxidative stress." Free Radic Biol Med **31** (6) : 717-728.
- Arai, F., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Nakamura, Y., Gomei, Y., Iwasaki, H. and Suda, T. (2009). "Niche regulation of hematopoietic stem cells in the endosteum." Ann N Y Acad Sci **1176** 36-46.
- Aubin, I., Adams, C. P., Opsahl, S., Septier, D., Bishop, C. E., Auge, N., Salvayre, R., Negre-Salvayre, A., Goldberg, M., Guenet, J. L., *et al.* (2005). "A deletion in the gene encoding sphingomyelin phosphodiesterase 3 (Smpd3) results in osteogenesis and dentinogenesis imperfecta in the mouse." Nat Genet **37** (8) : 803-805.
- Auge, N., Nikolova-Karakashian, M., Carpentier, S., Parthasarathy, S., Negre-Salvayre, A., Salvayre, R., Merrill, A. H., Jr. and Levade, T. (1999). "Role of sphingosine 1-phosphate in the mitogenesis induced by oxidized low density lipoprotein in smooth muscle cells via activation of sphingomyelinase, ceramidase, and sphingosine kinase." J Biol Chem **274** (31) : 21533-21538.
- Aureli, M., Murdica, V., Loberto, N., Samarani, M., Prinetti, A., Bassi, R. and Sonnino, S. (2014). "Exploring the link between ceramide and ionizing radiation." Glycoconj J **31** (6-7) : 449-459.
- Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., Griffiths, G. and Ktistakis, N. T. (2008). "Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum." J Cell Biol **182** (4) : 685-701.
- Bache, K. G., Stuffers, S., Malerod, L., Slagsvold, T., Raiborg, C., Lechardeur, D., Walchli, S., Lukacs, G. L., Brech, A. and Stenmark, H. (2006). "The ESCRT-III subunit hVps24 is required for degradation but not silencing of the epidermal growth factor receptor." Mol Biol Cell **17** (6) : 2513-2523.

- Balkwill, F. R., Lee, A., Aldam, G., Moodie, E., Thomas, J. A., Tavernier, J. and Fiers, W. (1986). "Human tumor xenografts treated with recombinant human tumor necrosis factor alone or in combination with interferons." Cancer Res **46** (8) : 3990-3993.
- Barreda, D. R., Hanington, P. C. and Belosevic, M. (2004). "Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors." Dev Comp Immunol **28** (5) : 509-554.
- Behre, G., Whitmarsh, A. J., Coghlan, M. P., Hoang, T., Carpenter, C. L., Zhang, D. E., Davis, R. J. and Tenen, D. G. (1999). "c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor." J Biol Chem **274** (8) : 4939-4946.
- Bennett, C. L., Silver, S. M., Djulbegovic, B., Samaras, A. T., Blau, C. A., Gleason, K. J., Barnato, S. E., Elverman, K. M., Courtney, D. M., McKoy, J. M., *et al.* (2008). "Venous thromboembolism and mortality associated with recombinant erythropoietin and darbepoetin administration for the treatment of cancer-associated anemia." JAMA **299** (8) : 914-924.
- Benz, C., Copley, M. R., Kent, D. G., Wohrer, S., Cortes, A., Aghaeepour, N., Ma, E., Mader, H., Rowe, K., Day, C., *et al.* (2012). "Hematopoietic stem cell subtypes expand differentially during development and display distinct lymphopoietic programs." Cell Stem Cell **10** (3) : 273-283.
- Berg, T. O., Fengsrud, M., Stromhaug, P. E., Berg, T. and Seglen, P. O. (1998). "Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes." J Biol Chem **273** (34) : 21883-21892.
- Bergamaschi, G., Di Sabatino, A., Albertini, R., Ardizzone, S., Biancheri, P., Bonetti, E., Cassinotti, A., Cazzola, P., Markopoulos, K., Massari, A., *et al.* (2010). "Prevalence and pathogenesis of anemia in inflammatory bowel disease. Influence of anti-tumor necrosis factor-alpha treatment." Haematologica **95** (2) : 199-205.
- Betin, V. M., Singleton, B. K., Parsons, S. F., Anstee, D. J. and Lane, J. D. (2013). "Autophagy facilitates organelle clearance during differentiation of human erythroblasts: evidence for a role for ATG4 paralogs during autophagosome maturation." Autophagy **9** (6) : 881-893.
- Bhattacharya, A., Wei, Q., Shin, J. N., Abdel Fattah, E., Bonilla, D. L., Xiang, Q. and Eissa, N. T. (2015). "Autophagy Is Required for Neutrophil-Mediated Inflammation." Cell Rep **12** (11) : 1731-1739.
- Bilderback, T. R., Gazula, V. R. and Dobrowsky, R. T. (2001). "Phosphoinositide 3-kinase regulates crosstalk between Trk A tyrosine kinase and p75(NTR)-dependent sphingolipid signaling pathways." J Neurochem **76** (5) : 1540-1551.



- Birgegard, G., Aapro, M. S., Bokemeyer, C., Dicato, M., Drings, P., Hornedo, J., Krzakowski, M., Ludwig, H., Pecorelli, S., Schmoll, H., *et al.* (2005). "Cancer-related anemia: pathogenesis, prevalence and treatment." *Oncology* **68 Suppl 1** 3-11.
- Bishop, T. R., Miller, M. W., Beall, J., Zon, L. I. and Dierks, P. (1996). "Genetic regulation of delta-aminolevulinatase during erythropoiesis." *Nucleic Acids Res* **24** (13) : 2511-2518.
- Bissels, U., Bosio, A. and Wagner, W. (2012). "MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape." *Haematologica* **97** (2) : 160-167.
- Bjerregaard, M. D., Jurlander, J., Klausen, P., Borregaard, N. and Cowland, J. B. (2003). "The in vivo profile of transcription factors during neutrophil differentiation in human bone marrow." *Blood* **101** (11) : 4322-4332.
- Bjorklund, S., Palmberg, S., Rask, S., Westerdahl, A. C. and Tornquist, K. (2005). "Effects of sphingosine 1-phosphate on calcium signaling, proliferation and S1P2 receptor expression in PC Cl3 rat thyroid cells." *Mol Cell Endocrinol* **231** (1-2) : 65-74.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., *et al.* (1997). "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells." *Nature* **385** (6618) : 729-733.
- Blick, M., Sherwin, S. A., Rosenblum, M. and Gutterman, J. (1987). "Phase I study of recombinant tumor necrosis factor in cancer patients." *Cancer Res* **47** (11) : 2986-2989.
- Blom van Assendelft, G., Hanscombe, O., Grosveld, F. and Greaves, D. R. (1989). "The beta-globin dominant control region activates homologous and heterologous promoters in a tissue-specific manner." *Cell* **56** (6) : 969-977.
- Bohlius, J., Schmidlin, K., Brillant, C., Schwarzer, G., Trelle, S., Seidenfeld, J., Zwahlen, M., Clarke, M., Weingart, O., Kluge, S., *et al.* (2009). "Recombinant human erythropoiesis-stimulating agents and mortality in patients with cancer: a meta-analysis of randomised trials." *Lancet* **373** (9674) : 1532-1542.
- Borregaard, N., Sorensen, O. E. and Theilgaard-Monch, K. (2007). "Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins." *Trends Immunol* **28** (8) : 340-345.
- Boya, P., Reggiori, F. and Codogno, P. (2013). "Emerging regulation and functions of autophagy." *Nat Cell Biol* **15** (7) : 713-720.
- Bremer, E. (2013). "Targeting of the tumor necrosis factor receptor superfamily for cancer immunotherapy." *ISRN Oncol* **2013** 371854.

Brenner, B., Ferlinz, K., Grassme, H., Weller, M., Koppenhoefer, U., Dichgans, J., Sandhoff, K., Lang, F. and Gulbins, E. (1998). "Fas/CD95/Apo-I activates the acidic sphingomyelinase via caspases." Cell Death Differ **5** (1) : 29-37.

Bresnick, E. H., Lee, H. Y., Fujiwara, T., Johnson, K. D. and Keles, S. (2010). "GATA switches as developmental drivers." J Biol Chem **285** (41) : 31087-31093.

Brigger, D., Proikas-Cezanne, T. and Tschan, M. P. (2014). "WIPI-dependent autophagy during neutrophil differentiation of NB4 acute promyelocytic leukemia cells." Cell Death Dis **5** e1315.

Brozik, A., Casey, N. P., Hegedus, C., Bors, A., Kozma, A., Andrikovics, H., Geiszt, M., Nemet, K. and Magocsi, M. (2006). "Reduction of Bcr-Abl function leads to erythroid differentiation of K562 cells via downregulation of ERK." Ann N Y Acad Sci **1090** 344-354.

Bruchova-Votavova, H., Yoon, D. and Prchal, J. T. (2010). "miR-451 enhances erythroid differentiation in K562 cells." Leuk Lymphoma **51** (4) : 686-693.

Buck, I., Morceau, F., Cristofanon, S., Heintz, C., Chateauvieux, S., Reuter, S., Dicato, M. and Diederich, M. (2008). "Tumor necrosis factor alpha inhibits erythroid differentiation in human erythropoietin-dependent cells involving p38 MAPK pathway, GATA-1 and FOG-1 downregulation and GATA-2 upregulation." Biochem Pharmacol **76** (10) : 1229-1239.

Buck, I., Morceau, F., Cristofanon, S., Reuter, S., Dicato, M. and Diederich, M. (2009). "The inhibitory effect of the proinflammatory cytokine TNFalpha on erythroid differentiation involves erythroid transcription factor modulation." Int J Oncol **34** (3) : 853-860.

Buitenhuis, M., Verhagen, L. P., van Deutekom, H. W., Castor, A., Verploegen, S., Koenderman, L., Jacobsen, S. E. and Coffey, P. J. (2008). "Protein kinase B (c-akt) regulates hematopoietic lineage choice decisions during myelopoiesis." Blood **111** (1) : 112-121.

Burda, P., Laslo, P. and Stopka, T. (2010). "The role of PU.1 and GATA-1 transcription factors during normal and leukemogenic hematopoiesis." Leukemia **24** (7) : 1249-1257.

Byrd, T. F. and Horwitz, M. A. (1993). "Regulation of transferrin receptor expression and ferritin content in human mononuclear phagocytes. Coordinate upregulation by iron transferrin and downregulation by interferon gamma." J Clin Invest **91** (3) : 969-976.

Cao, A. and Moi, P. (2002). "Regulation of the globin genes." Pediatr Res **51** (4) : 415-421.

Carlisle, G. W., Smith, D. H. and Wiedmann, M. (2004). "Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation." Blood **103** (11) : 4310-4316.

Castro, B. M., Prieto, M. and Silva, L. C. (2014). "Ceramide: a simple sphingolipid with unique biophysical properties." Prog Lipid Res **54** 53-67.

Chalfant, C. E. and Spiegel, S. (2005). "Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling." J Cell Sci **118** (Pt 20) : 4605-4612.

Chasis, J. A. (2006). "Erythroblastic islands: specialized microenvironmental niches for erythropoiesis." Curr Opin Hematol **13** (3) : 137-141.

Chasis, J. A. and Mohandas, N. (2008). "Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis." Blood **112** (3) : 470-478.

Chateauvieux, S., Grigorakaki, C., Morceau, F., Dicato, M. and Diederich, M. (2011). "Erythropoietin, erythropoiesis and beyond." Biochem Pharmacol **82** (10) : 1291-1303.

Cheloufi, S., Dos Santos, C. O., Chong, M. M. and Hannon, G. J. (2010). "A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis." Nature **465** (7298) : 584-589.

Chen, D., Huang, J., Zhang, K., Pan, B., Chen, J., De, W., Wang, R. and Chen, L. (2014). "MicroRNA-451 induces epithelial-mesenchymal transition in docetaxel-resistant lung adenocarcinoma cells by targeting proto-oncogene c-Myc." Eur J Cancer **50** (17) : 3050-3067.

Chen, H. M., Zhang, P., Voso, M. T., Hohaus, S., Gonzalez, D. A., Glass, C. K., Zhang, D. E. and Tenen, D. G. (1995). "Neutrophils and monocytes express high levels of PU.1 (Spi-1) but not Spi-B." Blood **85** (10) : 2918-2928.

Chen, S., Li, P., Li, J., Wang, Y., Du, Y., Chen, X., Zang, W., Wang, H., Chu, H., Zhao, G., *et al.* (2015). "MiR-144 inhibits proliferation and induces apoptosis and autophagy in lung cancer cells by targeting TIGAR." Cell Physiol Biochem **35** (3) : 997-1007.

Chen, X. L., Grey, J. Y., Thomas, S., Qiu, F. H., Medford, R. M., Wasserman, M. A. and Kunsch, C. (2004). "Sphingosine kinase-1 mediates TNF-alpha-induced MCP-1 gene expression in endothelial cells: upregulation by oscillatory flow." Am J Physiol Heart Circ Physiol **287** (4) : H1452-1458.

Chhabra, R., Dubey, R. and Saini, N. (2010). "Cooperative and individualistic functions of the microRNAs in the miR-23a~27a~24-2 cluster and its implication in human diseases." Mol Cancer **9** 232.

Chiabrando, D., Mercurio, S. and Tolosano, E. (2014). "Heme and erythropoiesis: more than a structural role." Haematologica **99** (6) : 973-983.

Ciriza, J., Thompson, H., Petrosian, R., Manilay, J. O. and Garcia-Ojeda, M. E. (2013). "The migration of hematopoietic progenitors from the fetal liver to the fetal

bone marrow: lessons learned and possible clinical applications." Exp Hematol **41** (5) : 411-423.

Clarke, C. J., Shamseddine, A. A., Jacob, J. J., Khalife, G., Burns, T. A. and Hannun, Y. A. (2016). "ATRA transcriptionally induces nSMase2 through CBP/p300-mediated histone acetylation." J Lipid Res **57** (5) : 868-881.

Clarke, C. J., Snook, C. F., Tani, M., Matmati, N., Marchesini, N. and Hannun, Y. A. (2006). "The extended family of neutral sphingomyelinases." Biochemistry **45** (38) : 11247-11256.

Clarke, C. J., Truong, T. G. and Hannun, Y. A. (2007). "Role for neutral sphingomyelinase-2 in tumor necrosis factor alpha-stimulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM) in lung epithelial cells: p38 MAPK is an upstream regulator of nSMase2." J Biol Chem **282** (2) : 1384-1396.

Corcoran, C. A., He, Q., Ponnusamy, S., Ogretmen, B., Huang, Y. and Sheikh, M. S. (2008). "Neutral sphingomyelinase-3 is a DNA damage and nongenotoxic stress-regulated gene that is deregulated in human malignancies." Mol Cancer Res **6** (5) : 795-807.

Corrado, A., Di Bello, V., d'Onofrio, F., Maruotti, N. and Cantatore, F. P. (2017). "Anti-TNF-alpha effects on anemia in rheumatoid and psoriatic arthritis." Int J Immunopathol Pharmacol 394632017714695.

Cox, T. C., Bawden, M. J., Martin, A. and May, B. K. (1991). "Human erythroid 5-aminolevulinate synthase: promoter analysis and identification of an iron-responsive element in the mRNA." EMBO J **10** (7) : 1891-1902.

Cremesti, A., Paris, F., Grassme, H., Holler, N., Tschopp, J., Fuks, Z., Gulbins, E. and Kolesnick, R. (2001). "Ceramide enables fas to cap and kill." J Biol Chem **276** (26) : 23954-23961.

Cumano, A. and Godin, I. (2007). "Ontogeny of the hematopoietic system." Annu Rev Immunol **25** 745-785.

Curtale, G., Citarella, F., Carissimi, C., Goldoni, M., Carucci, N., Fulci, V., Franceschini, D., Meloni, F., Barnaba, V. and Macino, G. (2010). "An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes." Blood **115** (2) : 265-273.

Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, S. and Spiegel, S. (1996). "Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate." Nature **381** (6585) : 800-803.

Cuvillier, O., Rosenthal, D. S., Smulson, M. E. and Spiegel, S. (1998). "Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase

and lamins during Fas- and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes." J Biol Chem **273** (5) : 2910-2916.

D'Adamo, S., Alvarez-Garcia, O., Muramatsu, Y., Flamigni, F. and Lotz, M. K. (2016). "MicroRNA-155 suppresses autophagy in chondrocytes by modulating expression of autophagy proteins." Osteoarthritis Cartilage **24** (6) : 1082-1091.

Dahl, R., Walsh, J. C., Lancki, D., Laslo, P., Iyer, S. R., Singh, H. and Simon, M. C. (2003). "Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor." Nat Immunol **4** (10) : 1029-1036.

Dai, C. H., Price, J. O., Brunner, T. and Krantz, S. B. (1998). "Fas ligand is present in human erythroid colony-forming cells and interacts with Fas induced by interferon gamma to produce erythroid cell apoptosis." Blood **91** (4) : 1235-1242.

Dallaglio, G., North, M., Worden, B. D. and Means, R. T., Jr. (1999). "Inhibition of human erythroid colony formation by ceramide." Exp Hematol **27** (7) : 1133-1138.

Dan, H. C. and Baldwin, A. S. (2008). "Differential involvement of IkappaB kinases alpha and beta in cytokine- and insulin-induced mammalian target of rapamycin activation determined by Akt." J Immunol **180** (11) : 7582-7589.

Danby, R. and Rocha, V. (2014). "Improving engraftment and immune reconstitution in umbilical cord blood transplantation." Front Immunol **5** 68.

de Bruin, A. M., Voermans, C. and Nolte, M. A. (2014). "Impact of interferon-gamma on hematopoiesis." Blood **124** (16) : 2479-2486.

de Oliveira Junior, W. V., Sabino Ade, P., Figueiredo, R. C. and Rios, D. R. (2015). "Inflammation and poor response to treatment with erythropoietin in chronic kidney disease." J Bras Nefrol **37** (2) : 255-263.

Debeljak, N., Solar, P. and Sytkowski, A. J. (2014). "Erythropoietin and cancer: the unintended consequences of anemia correction." Front Immunol **5** 563.

Deiss, L. P., Galinka, H., Berissi, H., Cohen, O. and Kimchi, A. (1996). "Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha." EMBO J **15** (15) : 3861-3870.

Delfau-Larue, M. H., Martasek, P. and Grandchamp, B. (1994). "Coproporphyrinogen oxidase: gene organization and description of a mutation leading to exon 6 skipping." Hum Mol Genet **3** (8) : 1325-1330.

Demarchi, F., Bertoli, C., Greer, P. A. and Schneider, C. (2005). "Ceramide triggers an NF-kappaB-dependent survival pathway through calpain." Cell Death Differ **12** (5) : 512-522.

- Deng, X., Ito, T., Carr, B., Mumby, M. and May, W. S., Jr. (1998). "Reversible phosphorylation of Bcl2 following interleukin 3 or bryostatin 1 is mediated by direct interaction with protein phosphatase 2A." J Biol Chem **273** (51) : 34157-34163.
- DeVilbiss, A. W., Tanimura, N., McIver, S. C., Katsumura, K. R., Johnson, K. D. and Bresnick, E. H. (2016). "Navigating Transcriptional Coregulator Ensembles to Establish Genetic Networks: A GATA Factor Perspective." Curr Top Dev Biol **118** 205-244.
- Di Bartolomeo, S., Corazzari, M., Nazio, F., Oliverio, S., Lisi, G., Antonioli, M., Pagliarini, V., Matteoni, S., Fuoco, C., Giunta, L., *et al.* (2010). "The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy." J Cell Biol **191** (1) : 155-168.
- Dicato, M. and Plawny, L. (2010). "Erythropoietin in cancer patients: pros and cons." Curr Opin Oncol **22** (4) : 307-311.
- Dice, J. F., Chiang, H. L., Spencer, E. P. and Backer, J. M. (1986). "Regulation of catabolism of microinjected ribonuclease A. Identification of residues 7-11 as the essential pentapeptide." J Biol Chem **261** (15) : 6853-6859.
- Dobrowsky, R. T., Kamibayashi, C., Mumby, M. C. and Hannun, Y. A. (1993). "Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A." J Biol Chem **268** (21) : 15523-15530.
- Dooley, H. C., Razi, M., Polson, H. E., Girardin, S. E., Wilson, M. I. and Tooze, S. A. (2014). "WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1." Mol Cell **55** (2) : 238-252.
- Dore, L. C., Amigo, J. D., Dos Santos, C. O., Zhang, Z., Gai, X., Tobias, J. W., Yu, D., Klein, A. M., Dorman, C., Wu, W., *et al.* (2008). "A GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis." Proc Natl Acad Sci U S A **105** (9) : 3333-3338.
- Dri, P., Gasparini, C., Menegazzi, R., Cramer, R., Alberi, L., Presani, G., Garbisa, S. and Patriarca, P. (2000). "TNF-Induced shedding of TNF receptors in human polymorphonuclear leukocytes: role of the 55-kDa TNF receptor and involvement of a membrane-bound and non-matrix metalloproteinase." J Immunol **165** (4) : 2165-2172.
- Drissen, R., Palstra, R. J., Gillemans, N., Splinter, E., Grosveld, F., Philipsen, S. and de Laat, W. (2004). "The active spatial organization of the beta-globin locus requires the transcription factor EKLF." Genes Dev **18** (20) : 2485-2490.
- Duan, R. D., Hertervig, E., Nyberg, L., Hauge, T., Sternby, B., Lillienau, J., Farooqi, A. and Nilsson, A. (1996). "Distribution of alkaline sphingomyelinase activity in human beings and animals. Tissue and species differences." Dig Dis Sci **41** (9) : 1801-1806.

- Dupont, F. O., Gagnon, R., Ardilouze, J. L. and Auray-Blais, C. (2011). "Determination of glycated and acetylated hemoglobins in cord blood by time-of-flight mass spectrometry." Anal Chem **83** (13) : 5245-5252.
- Dworski, S., Berger, A., Furlonger, C., Moreau, J. M., Yoshimitsu, M., Trentadue, J., Au, B. C., Paige, C. J. and Medin, J. A. (2015). "Markedly perturbed hematopoiesis in acid ceramidase deficient mice." Haematologica **100** (5) : e162-165.
- Dzierzak, E. and Philipsen, S. (2013). "Erythropoiesis: development and differentiation." Cold Spring Harb Perspect Med **3** (4) : a011601.
- Ehlert, K., Frosch, M., Fehse, N., Zander, A., Roth, J. and Vormoor, J. (2007). "Farber disease: clinical presentation, pathogenesis and a new approach to treatment." Pediatr Rheumatol Online J **5** 15.
- Ek, T., Mellander, L. and Abrahamsson, J. (2005). "Interferon gamma and tumour necrosis factor alpha in relation to anaemia and prognosis in childhood cancer." Acta Paediatr **94** (4) : 435-437.
- El Alwani, M., Wu, B. X., Obeid, L. M. and Hannun, Y. A. (2006). "Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response." Pharmacol Ther **112** (1) : 171-183.
- El-Assaad, W., El-Sabban, M., Awaraji, C., Abboushi, N. and Dbaibo, G. S. (1998). "Distinct sites of action of Bcl-2 and Bcl-xL in the ceramide pathway of apoptosis." Biochem J **336** ( Pt 3) 735-741.
- Ema, H., Morita, Y. and Suda, T. (2014). "Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells." Exp Hematol **42** (2) : 74-82 e72.
- Ermolaeva, M. A., Michallet, M. C., Papadopoulou, N., Utermohlen, O., Kranidioti, K., Kollias, G., Tschopp, J. and Pasparakis, M. (2008). "Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses." Nat Immunol **9** (9) : 1037-1046.
- Eskelinen, E. L., Illert, A. L., Tanaka, Y., Schwarzmann, G., Blanz, J., Von Figura, K. and Saftig, P. (2002). "Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy." Mol Biol Cell **13** (9) : 3355-3368.
- Fabian, M. R., Sonenberg, N. and Filipowicz, W. (2010). "Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs." Annu Rev Biochem **79** 351-379.
- Fader, C. M., Salassa, B. N., Grosso, R. A., Vergara, A. N. and Colombo, M. I. (2016). "Hemin induces mitophagy in a leukemic erythroblast cell line." Biol Cell **108** (4) : 77-95.
- Fader, C. M., Sanchez, D., Furlan, M. and Colombo, M. I. (2008). "Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells." Traffic **9** (2) : 230-250.

- Fader, C. M., Sanchez, D. G., Mestre, M. B. and Colombo, M. I. (2009). "TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways." Biochim Biophys Acta **1793** (12) : 1901-1916.
- Fader, C. M., Savina, A., Sanchez, D. and Colombo, M. I. (2005). "Exosome secretion and red cell maturation: Exploring molecular components involved in the docking and fusion of multivesicular bodies in K562 cells." Blood Cells Mol Dis **35** (2) : 153-157.
- Faquin, W. C., Schneider, T. J. and Goldberg, M. A. (1992). "Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production." Blood **79** (8) : 1987-1994.
- Farre, J. C. and Subramani, S. (2016). "Mechanistic insights into selective autophagy pathways: lessons from yeast." Nat Rev Mol Cell Biol **17** (9) : 537-552.
- Fass, E., Shvets, E., Degani, I., Hirschberg, K. and Elazar, Z. (2006). "Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes." J Biol Chem **281** (47) : 36303-36316.
- Fazi, F., Rosa, A., Fatica, A., Gelmetti, V., De Marchis, M. L., Nervi, C. and Bozzoni, I. (2005). "A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis." Cell **123** (5) : 819-831.
- Felli, N., Fontana, L., Pelosi, E., Botta, R., Bonci, D., Facchiano, F., Liuzzi, F., Lulli, V., Morsilli, O., Santoro, S., *et al.* (2005). "MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation." Proc Natl Acad Sci U S A **102** (50) : 18081-18086.
- Felli, N., Pedini, F., Romania, P., Biffoni, M., Morsilli, O., Castelli, G., Santoro, S., Chicarella, S., Sorrentino, A., Peschle, C., *et al.* (2009). "MicroRNA 223-dependent expression of LMO2 regulates normal erythropoiesis." Haematologica **94** (4) : 479-486.
- Feng, L., Gell, D. A., Zhou, S., Gu, L., Kong, Y., Li, J., Hu, M., Yan, N., Lee, C., Rich, A. M., *et al.* (2004). "Molecular mechanism of AHSP-mediated stabilization of alpha-hemoglobin." Cell **119** (5) : 629-640.
- Feng, Y., He, D., Yao, Z. and Klionsky, D. J. (2014). "The machinery of macroautophagy." Cell Res **24** (1) : 24-41.
- Ferlinz, K., Kopal, G., Bernardo, K., Linke, T., Bar, J., Breiden, B., Neumann, U., Lang, F., Schuchman, E. H. and Sandhoff, K. (2001). "Human acid ceramidase: processing, glycosylation, and lysosomal targeting." J Biol Chem **276** (38) : 35352-35360.
- Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M. and Philipsen, S. (2005). "GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis." Mol Cell Biol **25** (4) : 1215-1227.



Fiedler, K. and Brunner, C. (2012). "The role of transcription factors in the guidance of granulopoiesis." Am J Blood Res **2** (1) : 57-65.

Filimonenko, M., Stuffers, S., Raiborg, C., Yamamoto, A., Malerod, L., Fisher, E. M., Isaacs, A., Brech, A., Stenmark, H. and Simonsen, A. (2007). "Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease." J Cell Biol **179** (3) : 485-500.

Filosto, S., Ashfaq, M., Chung, S., Fry, W. and Goldkorn, T. (2012). "Neutral sphingomyelinase 2 activity and protein stability are modulated by phosphorylation of five conserved serines." J Biol Chem **287** (1) : 514-522.

Filosto, S., Fry, W., Knowlton, A. A. and Goldkorn, T. (2010). "Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) is a phosphoprotein regulated by calcineurin (PP2B)." J Biol Chem **285** (14) : 10213-10222.

Fimia, G. M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari, M., Fuoco, C., Ucar, A., Schwartz, P., *et al.* (2007). "Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system." Nature **447** (7148) : 1121-1125.

Fox, A. H., Liew, C., Holmes, M., Kowalski, K., Mackay, J. and Crossley, M. (1999). "Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers." EMBO J **18** (10) : 2812-2822.

Frampton, J., Walker, M., Plumb, M. and Harrison, P. R. (1990). "Synergy between the NF-E1 erythroid-specific transcription factor and the CACCC factor in the erythroid-specific promoter of the human porphobilinogen deaminase gene." Mol Cell Biol **10** (7) : 3838-3842.

Frede, S., Fandrey, J., Pagel, H., Hellwig, T. and Jelkmann, W. (1997). "Erythropoietin gene expression is suppressed after lipopolysaccharide or interleukin-1 beta injections in rats." Am J Physiol **273** (3 Pt 2) : R1067-1071.

Friedman, A. D. (2015). "C/EBPalpha in normal and malignant myelopoiesis." Int J Hematol **101** (4) : 330-341.

Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T. and Yoshimori, T. (2008). "The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy." Mol Biol Cell **19** (5) : 2092-2100.

Fukao, T., Fukuda, Y., Kiga, K., Sharif, J., Hino, K., Enomoto, Y., Kawamura, A., Nakamura, K., Takeuchi, T. and Tanabe, M. (2007). "An evolutionarily conserved mechanism for microRNA-223 expression revealed by microRNA gene profiling." Cell **129** (3) : 617-631.

Gallagher, P. G., Liem, R. I., Wong, E., Weiss, M. J. and Bodine, D. M. (2005). "GATA-1 and Oct-1 are required for expression of the human alpha-hemoglobin-stabilizing protein gene." J Biol Chem **280** (47) : 39016-39023.

- Ganley, I. G., Lam du, H., Wang, J., Ding, X., Chen, S. and Jiang, X. (2009). "ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy." J Biol Chem **284** (18) : 12297-12305.
- Gault, C. R., Obeid, L. M. and Hannun, Y. A. (2010). "An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown." Adv Exp Med Biol **688** 1-23.
- Ghani, S., Riemke, P., Schonheit, J., Lenze, D., Stumm, J., Hoogenkamp, M., Lagendijk, A., Heinz, S., Bonifer, C., Bakkers, J., *et al.* (2011). "Macrophage development from HSCs requires PU.1-coordinated microRNA expression." Blood **118** (8) : 2275-2284.
- Gilreath, J. A., Stenehjem, D. D. and Rodgers, G. M. (2014). "Diagnosis and treatment of cancer-related anemia." Am J Hematol **89** (2) : 203-212.
- Glaspay, J., Crawford, J., Vansteenkiste, J., Henry, D., Rao, S., Bowers, P., Berlin, J. A., Tomita, D., Bridges, K. and Ludwig, H. (2010). "Erythropoiesis-stimulating agents in oncology: a study-level meta-analysis of survival and other safety outcomes." Br J Cancer **102** (2) : 301-315.
- Goasguen, J. E., Bennett, J. M., Bain, B. J., Vallespi, T., Brunning, R., Mufti, G. J. and International Working Group on Morphology of Myelodysplastic, S. (2009). "Morphological evaluation of monocytes and their precursors." Haematologica **94** (7) : 994-997.
- Golub, R. and Cumano, A. (2013). "Embryonic hematopoiesis." Blood Cells Mol Dis **51** (4) : 226-231.
- Gomei, Y., Nakamura, Y., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Iwasaki, H., Suda, T. and Arai, F. (2010). "Functional differences between two Tie2 ligands, angiopoietin-1 and -2, in regulation of adult bone marrow hematopoietic stem cells." Exp Hematol **38** (2) : 82-89.
- Gomes, A. C. and Gomes, M. S. (2016). "Hematopoietic niches, erythropoiesis and anemia of chronic infection." Exp Hematol **44** (2) : 85-91.
- Gomez-Munoz, A., Kong, J., Salh, B. and Steinbrecher, U. P. (2003). "Sphingosine-1-phosphate inhibits acid sphingomyelinase and blocks apoptosis in macrophages." FEBS Lett **539** (1-3) : 56-60.
- Gomez-Puerto, M. C., Folkerts, H., Wierenga, A. T., Schepers, K., Schuringa, J. J., Coffey, P. J. and Vellenga, E. (2016). "Autophagy Proteins ATG5 and ATG7 Are Essential for the Maintenance of Human CD34(+) Hematopoietic Stem-Progenitor Cells." Stem Cells **34** (6) : 1651-1663.
- Gonzalez, I. R., Moreno-Manzano, V., Rodriguez-Jimenez, F. J., Sepulveda, P. and Sanchez-Puelles, J. M. (2011). "The biology of HIFalpha proteins in cell differentiation and disease." Vitam Horm **87** 367-379.

Gordon, P. B. and Seglen, P. O. (1988). "Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways." Biochem Biophys Res Commun **151** (1) : 40-47.

Gorelik, A., Illes, K., Heinz, L. X., Superti-Furga, G. and Nagar, B. (2016). "Crystal structure of mammalian acid sphingomyelinase." Nat Commun **7** 12196.

Grabher, C., Payne, E. M., Johnston, A. B., Bolli, N., Lechman, E., Dick, J. E., Kanki, J. P. and Look, A. T. (2011). "Zebrafish microRNA-126 determines hematopoietic cell fate through c-Myb." Leukemia **25** (3) : 506-514.

Graf, T. and Enver, T. (2009). "Forcing cells to change lineages." Nature **462** (7273) : 587-594.

Grass, J. A., Boyer, M. E., Pal, S., Wu, J., Weiss, M. J. and Bresnick, E. H. (2003). "GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling." Proc Natl Acad Sci U S A **100** (15) : 8811-8816.

Grassme, H., Riethmuller, J. and Gulbins, E. (2007). "Biological aspects of ceramide-enriched membrane domains." Prog Lipid Res **46** (3-4) : 161-170.

Gregory, C. J. and Eaves, A. C. (1977). "Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses." Blood **49** (6) : 855-864.

Gregory, R. C., Taxman, D. J., Seshasayee, D., Kensinger, M. H., Bieker, J. J. and Wojchowski, D. M. (1996). "Functional interaction of GATA1 with erythroid Kruppel-like factor and Sp1 at defined erythroid promoters." Blood **87** (5) : 1793-1801.

Gregory, T., Yu, C., Ma, A., Orkin, S. H., Blobel, G. A. and Weiss, M. J. (1999). "GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression." Blood **94** (1) : 87-96.

Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., *et al.* (1995). "The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor." Cell **83** (5) : 793-802.

Grigorakaki, C., Morceau, F., Chateauvieux, S., Dicato, M. and Diederich, M. (2011). "Tumor necrosis factor alpha-mediated inhibition of erythropoiesis involves GATA-1/GATA-2 balance impairment and PU.1 over-expression." Biochem Pharmacol **82** (2) : 156-166.

Grimson, A., Srivastava, M., Fahey, B., Woodcroft, B. J., Chiang, H. R., King, N., Degan, B. M., Rokhsar, D. S. and Bartel, D. P. (2008). "Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals." Nature **455** (7217) : 1193-1197.

- Gu, L., Huang, B., Shen, W., Gao, L., Ding, Z., Wu, H. and Guo, J. (2013). "Early activation of nSMase2/ceramide pathway in astrocytes is involved in ischemia-associated neuronal damage via inflammation in rat hippocampi." J Neuroinflammation **10** 109.
- Guicciardi, M. E. and Gores, G. J. (2009). "Life and death by death receptors." FASEB J **23** (6) : 1625-1637.
- Guo, B. B., Bellingham, S. A. and Hill, A. F. (2015). "The neutral sphingomyelinase pathway regulates packaging of the prion protein into exosomes." J Biol Chem **290** (6) : 3455-3467.
- Gutierrez, M. G., Munafo, D. B., Beron, W. and Colombo, M. I. (2004). "Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells." J Cell Sci **117** (Pt 13) : 2687-2697.
- Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E. and Shaw, R. J. (2008). "AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint." Mol Cell **30** (2) : 214-226.
- Haimovici, A., Brigger, D., Torbett, B. E., Fey, M. F. and Tschan, M. P. (2014). "Induction of the autophagy-associated gene MAP1S via PU.1 supports APL differentiation." Leuk Res **38** (9) : 1041-1047.
- Hanel, P., Andreani, P. and Graler, M. H. (2007). "Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood." FASEB J **21** (4) : 1202-1209.
- Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S., Natsume, T., Guan, J. L. and Mizushima, N. (2008). "FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells." J Cell Biol **181** (3) : 497-510.
- Hardie, D. G. (2007). "AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy." Nat Rev Mol Cell Biol **8** (10) : 774-785.
- Heinrich, M., Wickel, M., Winoto-Morbach, S., Schneider-Brachert, W., Weber, T., Brunner, J., Saftig, P., Peters, C., Kronke, M. and Schutze, S. (2000). "Ceramide as an activator lipid of cathepsin D." Adv Exp Med Biol **477** 305-315.
- Hernandez-Hernandez, A., Ray, P., Litos, G., Ciro, M., Ottolenghi, S., Beug, H. and Boyes, J. (2006). "Acetylation and MAPK phosphorylation cooperate to regulate the degradation of active GATA-1." EMBO J **25** (14) : 3264-3274.
- Ho, K. K., McGuire, V. A., Koo, C. Y., Muir, K. W., de Olano, N., Maifoshie, E., Kelly, D. J., McGovern, U. B., Monteiro, L. J., Gomes, A. R., *et al.* (2012). "Phosphorylation of FOXO3a on Ser-7 by p38 promotes its nuclear localization in response to doxorubicin." J Biol Chem **287** (2) : 1545-1555.

Ho, T. T., Warr, M. R., Adelman, E. R., Lansinger, O. M., Flach, J., Verovskaya, E. V., Figueroa, M. E. and Passegue, E. (2017). "Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells." Nature **543** (7644) : 205-210.

Holm, T. M., Braun, A., Trigatti, B. L., Brugnara, C., Sakamoto, M., Krieger, M. and Andrews, N. C. (2002). "Failure of red blood cell maturation in mice with defects in the high-density lipoprotein receptor SR-BI." Blood **99** (5) : 1817-1824.

Hong, W., Nakazawa, M., Chen, Y. Y., Kori, R., Vakoc, C. R., Rakowski, C. and Blobel, G. A. (2005). "FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA-1." EMBO J **24** (13) : 2367-2378.

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., *et al.* (2009). "Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy." Mol Biol Cell **20** (7) : 1981-1991.

Hu, J., Liu, J., Xue, F., Halverson, G., Reid, M., Guo, A., Chen, L., Raza, A., Galili, N., Jaffray, J., *et al.* (2013). "Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo." Blood **121** (16) : 3246-3253.

Huang, J., Ge, M., Lu, S., Shi, J., Yu, W., Li, X., Wang, M., Zhang, J., Feng, S., Dong, S., *et al.* (2016). "Impaired Autophagy in Adult Bone Marrow CD34+ Cells of Patients with Aplastic Anemia: Possible Pathogenic Significance." PLoS One **11** (3) : e0149586.

Huang, L. E., Gu, J., Schau, M. and Bunn, H. F. (1998). "Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **95** (14) : 7987-7992.

Huang, X., Gschwend, E., Van Handel, B., Cheng, D., Mikkola, H. K. and Witte, O. N. (2011). "Regulated expression of microRNAs-126/126\* inhibits erythropoiesis from human embryonic stem cells." Blood **117** (7) : 2157-2165.

Huwiler, A., Brunner, J., Hummel, R., Vervoordeldonk, M., Stabel, S., van den Bosch, H. and Pfeilschifter, J. (1996). "Ceramide-binding and activation defines protein kinase c-Raf as a ceramide-activated protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **93** (14) : 6959-6963.

Huynh, K. K., Eskelinen, E. L., Scott, C. C., Malevanets, A., Saftig, P. and Grinstein, S. (2007). "LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes." EMBO J **26** (2) : 313-324.

Hyttinen, J. M., Niittykoski, M., Salminen, A. and Kaarniranta, K. (2013). "Maturation of autophagosomes and endosomes: a key role for Rab7." Biochim Biophys Acta **1833** (3) : 503-510.

Ikonomi, P., Noguchi, C. T., Miller, W., Kassahun, H., Hardison, R. and Schechter, A. N. (2000a). "Levels of GATA-1/GATA-2 transcription factors modulate expression of embryonic and fetal hemoglobins." Gene **261** (2) : 277-287.

Ikonomi, P., Rivera, C. E., Riordan, M., Washington, G., Schechter, A. N. and Noguchi, C. T. (2000b). "Overexpression of GATA-2 inhibits erythroid and promotes megakaryocyte differentiation." Exp Hematol **28** (12) : 1423-1431.

Imaizumi, T., Itaya, H., Fujita, K., Kudoh, D., Kudoh, S., Mori, K., Fujimoto, K., Matsumiya, T., Yoshida, H. and Satoh, K. (2000). "Expression of tumor necrosis factor-alpha in cultured human endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide or interleukin-1alpha." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20** (2) : 410-415.

Iordanov, M. S., Kirsch, J. D., Ryabinina, O. P., Wong, J., Spitz, P. N., Korcheva, V. B., Thorburn, A. and Magun, B. E. (2005). "Recruitment of TRADD, FADD, and caspase 8 to double-stranded RNA-triggered death inducing signaling complexes (dsRNA-DISCs)." Apoptosis **10** (1) : 167-176.

Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K. and Mizushima, N. (2008). "Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG." Mol Biol Cell **19** (12) : 5360-5372.

Ito, H., Murakami, M., Furuhata, A., Gao, S., Yoshida, K., Sobue, S., Hagiwara, K., Takagi, A., Kojima, T., Suzuki, M., *et al.* (2009). "Transcriptional regulation of neutral sphingomyelinase 2 gene expression of a human breast cancer cell line, MCF-7, induced by the anti-cancer drug, daunorubicin." Biochim Biophys Acta **1789** (11-12) : 681-690.

Iwasaki, H. and Akashi, K. (2007). "Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell." Immunity **26** (6) : 726-740.

Jacquel, A., Colosetti, P., Grosso, S., Belhacene, N., Puissant, A., Marchetti, S., Breittmayer, J. P. and Auberger, P. (2007). "Apoptosis and erythroid differentiation triggered by Bcr-Abl inhibitors in CML cell lines are fully distinguishable processes that exhibit different sensitivity to caspase inhibition." Oncogene **26** (17) : 2445-2458.

Jacquel, A., Obba, S., Boyer, L., Dufies, M., Robert, G., Gounon, P., Lemichez, E., Luciano, F., Solary, E. and Auberger, P. (2012). "Autophagy is required for CSF-1-induced macrophagic differentiation and acquisition of phagocytic functions." Blood **119** (19) : 4527-4531.

Jarman, A. P., Wood, W. G., Sharpe, J. A., Gourdon, G., Ayyub, H. and Higgs, D. R. (1991). "Characterization of the major regulatory element upstream of the human alpha-globin gene cluster." Mol Cell Biol **11** (9) : 4679-4689.

Jeannesson, P., Lahlil, R., Chenais, B., Devy, L., Gillet, R., Aries, A., Morceau, F. and Trentesaux, C. (1997). "Anthracyclines as tumor cell differentiating agents: effects on the regulation of erythroid gene expression." Leuk Lymphoma **26** (5-6) : 575-587.

- Jelkmann, W. (1998). "Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production." J Interferon Cytokine Res **18** (8) : 555-559.
- Jenkins, R. W., Canals, D. and Hannun, Y. A. (2009). "Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase." Cell Signal **21** (6) : 836-846.
- Jenkins, R. W., Idkowiak-Baldys, J., Simbari, F., Canals, D., Roddy, P., Riner, C. D., Clarke, C. J. and Hannun, Y. A. (2011). "A novel mechanism of lysosomal acid sphingomyelinase maturation: requirement for carboxyl-terminal proteolytic processing." J Biol Chem **286** (5) : 3777-3788.
- Jiang, L. I., Collins, J., Davis, R., Lin, K. M., DeCamp, D., Roach, T., Hsueh, R., Rebres, R. A., Ross, E. M., Taussig, R., *et al.* (2007). "Use of a cAMP BRET sensor to characterize a novel regulation of cAMP by the sphingosine 1-phosphate/G13 pathway." J Biol Chem **282** (14) : 10576-10584.
- Jiang, P. and Mizushima, N. (2014). "Autophagy and human diseases." Cell Res **24** (1) : 69-79.
- Johansen, T. and Lamark, T. (2011). "Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins." Autophagy **7** (3) : 279-296.
- Johnson, C. S., Chang, M. J. and Furmanski, P. (1988). "In vivo hematopoietic effects of tumor necrosis factor-alpha in normal and erythroleukemic mice: characterization and therapeutic applications." Blood **72** (6) : 1875-1883.
- Johnson, R. A., Waddelow, T. A., Caro, J., Oliff, A. and Roodman, G. D. (1989). "Chronic exposure to tumor necrosis factor in vivo preferentially inhibits erythropoiesis in nude mice." Blood **74** (1) : 130-138.
- Joo, J. H., Dorsey, F. C., Joshi, A., Hennessy-Walters, K. M., Rose, K. L., McCastlain, K., Zhang, J., Iyengar, R., Jung, C. H., Suen, D. F., *et al.* (2011). "Hsp90-Cdc37 chaperone complex regulates Ulk1- and Atg13-mediated mitophagy." Mol Cell **43** (4) : 572-585.
- Joshi, A. and Kundu, M. (2013). "Mitophagy in hematopoietic stem cells: the case for exploration." Autophagy **9** (11) : 1737-1749.
- Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S. H., Kim, Y. M., Otto, N. M., Cao, J., Kundu, M. and Kim, D. H. (2009). "ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery." Mol Biol Cell **20** (7) : 1992-2003.
- Kaltsonoudis, E., Voulgari, P. V., Konitsiotis, S. and Drosos, A. A. (2014). "Demyelination and other neurological adverse events after anti-TNF therapy." Autoimmun Rev **13** (1) : 54-58.
- Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T. and Tang, D. (2011). "The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis." Cell Death Differ **18** (4) : 571-580.

- Kang, Y. A., Sanalkumar, R., O'Geen, H., Linnemann, A. K., Chang, C. J., Bouhassira, E. E., Farnham, P. J., Keles, S. and Bresnick, E. H. (2012). "Autophagy driven by a master regulator of hematopoiesis." Mol Cell Biol **32** (1) : 226-239.
- Kaplan, B., Qazi, Y. and Wellen, J. R. (2014). "Strategies for the management of adverse events associated with mTOR inhibitors." Transplant Rev (Orlando) **28** (3) : 126-133.
- Kato, M., Yuan, H., Xu, Z. G., Lanting, L., Li, S. L., Wang, M., Hu, M. C., Reddy, M. A. and Natarajan, R. (2006). "Role of the Akt/FoxO3a pathway in TGF-beta1-mediated mesangial cell dysfunction: a novel mechanism related to diabetic kidney disease." J Am Soc Nephrol **17** (12) : 3325-3335.
- Katsuragi, Y., Ichimura, Y. and Komatsu, M. (2015). "p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor." FEBS J **282** (24) : 4672-4678.
- Kaushik, S. and Cuervo, A. M. (2012). "Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world." Trends Cell Biol **22** (8) : 407-417.
- Kawamoto, H., Wada, H. and Katsura, Y. (2010). "A revised scheme for developmental pathways of hematopoietic cells: the myeloid-based model." Int Immunol **22** (2) : 65-70.
- Kaya, A. H., Plewinska, M., Wong, D. M., Desnick, R. J. and Wetmur, J. G. (1994). "Human delta-aminolevulinate dehydratase (ALAD) gene: structure and alternative splicing of the erythroid and housekeeping mRNAs." Genomics **19** (2) : 242-248.
- Kent, G., Minick, O. T., Volini, F. I. and Orfei, E. (1966). "Autophagic vacuoles in human red cells." Am J Pathol **48** (5) : 831-857.
- Kim, B. W., Kwon, D. H. and Song, H. K. (2016). "Structure biology of selective autophagy receptors." BMB Rep **49** (2) : 73-80.
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D. M. (2002). "mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery." Cell **110** (2) : 163-175.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. and Guan, K. L. (2011a). "AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1." Nat Cell Biol **13** (2) : 132-141.
- Kim, J., Lee, K. S., Kim, J. H., Lee, D. K., Park, M., Choi, S., Park, W., Kim, S., Choi, Y. K., Hwang, J. Y., *et al.* (2017). "Aspirin prevents TNF-alpha-induced endothelial cell dysfunction by regulating the NF-kappaB-dependent miR-155/eNOS pathway: Role of a miR-155/eNOS axis in preeclampsia." Free Radic Biol Med **104** : 185-198.



Kim, M., Tan, Y. S., Cheng, W. C., Kingsbury, T. J., Heimfeld, S. and Civin, C. I. (2015). "MIR144 and MIR451 regulate human erythropoiesis via RAB14." Br J Haematol **168** (4) : 583-597.

Kim, M. Y., Linardic, C., Obeid, L. and Hannun, Y. (1991). "Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation." J Biol Chem **266** (1) : 484-489.

Kim, V. N., Han, J. and Siomi, M. C. (2009). "Biogenesis of small RNAs in animals." Nat Rev Mol Cell Biol **10** (2) : 126-139.

Kim, Y. M., Lim, S. C., Han, C. Y., Kay, H. Y., Cho, I. J., Ki, S. H., Lee, M. Y., Kwon, H. M., Lee, C. H. and Kim, S. G. (2011b). "G(alpha)12/13 induction of CYR61 in association with arteriosclerotic intimal hyperplasia: effect of sphingosine-1-phosphate." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31** (4) : 861-869.

Kingsley, P. D., Greenfest-Allen, E., Frame, J. M., Bushnell, T. P., Malik, J., McGrath, K. E., Stoeckert, C. J. and Palis, J. (2013). "Ontogeny of erythroid gene expression." Blood **121** (6) : e5-e13.

Klemsz, M. J., McKercher, S. R., Celada, A., Van Beveren, C. and Maki, R. A. (1990). "The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene." Cell **61** (1) : 113-124.

Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C. M., Adams, P. D., Adeli, K., *et al.* (2016). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)." Autophagy **12** (1) : 1-222.

Klionsky, D. J. and Codogno, P. (2013). "The mechanism and physiological function of macroautophagy." J Innate Immun **5** (5) : 427-433.

Kobune, M., Kohgo, Y., Kato, J., Miyazaki, E. and Niitsu, Y. (1994). "Interleukin-6 enhances hepatic transferrin uptake and ferritin expression in rats." Hepatology **19** (6) : 1468-1475.

Kodandapani, R., Pio, F., Ni, C. Z., Piccialli, G., Klemsz, M., McKercher, S., Maki, R. A. and Ely, K. R. (1996). "A new pattern for helix-turn-helix recognition revealed by the PU.1 ETS-domain-DNA complex." Nature **380** (6573) : 456-460.

Kolzer, M., Werth, N. and Sandhoff, K. (2004). "Interactions of acid sphingomyelinase and lipid bilayers in the presence of the tricyclic antidepressant desipramine." FEBS Lett **559** (1-3) : 96-98.

Kong, K. Y., Owens, K. S., Rogers, J. H., Mullenix, J., Velu, C. S., Grimes, H. L. and Dahl, R. (2010). "MIR-23A microRNA cluster inhibits B-cell development." Exp Hematol **38** (8) : 629-640 e621.

Kouhkan, F., Soleimani, M., Daliri, M., Behmanesh, M., Mobarra, N., Mossahebi Mohammadi, M., Mohammad, S., Mokhtari, M. and Lahmy, R. (2013). "miR-451 Up-regulation, Induce Erythroid Differentiation of CD133+cells Independent of Cytokine Cocktails." Iran J Basic Med Sci **16** (6) : 756-763.

Koury, M. J. (2014). "Abnormal erythropoiesis and the pathophysiology of chronic anemia." Blood Rev **28** (2) : 49-66.

Kulesa, H., Frampton, J. and Graf, T. (1995). "GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblats." Genes Dev **9** (10) : 1250-1262.

Kundu, M., Lindsten, T., Yang, C. Y., Wu, J., Zhao, F., Zhang, J., Selak, M. A., Ney, P. A. and Thompson, C. B. (2008). "Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation." Blood **112** (4) : 1493-1502.

Labbaye, C., Spinello, I., Quaranta, M. T., Pelosi, E., Pasquini, L., Petrucci, E., Biffoni, M., Nuzzolo, E. R., Billi, M., Foa, R., *et al.* (2008). "A three-step pathway comprising PLZF/miR-146a/CXCR4 controls megakaryopoiesis." Nat Cell Biol **10** (7) : 788-801.

Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M. L. and Bruick, R. K. (2002). "FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor." Genes Dev **16** (12) : 1466-1471.

Langmann, T., Buechler, C., Ries, S., Schaeffler, A., Aslanidis, C., Schuierer, M., Weiler, M., Sandhoff, K., de Jong, P. J. and Schmitz, G. (1999). "Transcription factors Sp1 and AP-2 mediate induction of acid sphingomyelinase during monocytic differentiation." J Lipid Res **40** (5) : 870-880.

Lapaquette, P., Guzzo, J., Bretilon, L. and Bringer, M. A. (2015). "Cellular and Molecular Connections between Autophagy and Inflammation." Mediators Inflamm **2015** 398483.

Laplante, M. and Sabatini, D. M. (2009). "mTOR signaling at a glance." J Cell Sci **122** (Pt 20) : 3589-3594.

Larsen, M. T., Hother, C., Hager, M., Pedersen, C. C., Theilgaard-Monch, K., Borregaard, N. and Cowland, J. B. (2013). "MicroRNA profiling in human neutrophils during bone marrow granulopoiesis and in vivo exudation." PLoS One **8** (3) : e58454.

Lavrik, I., Golks, A. and Krammer, P. H. (2005). "Death receptor signaling." J Cell Sci **118** (Pt 2) : 265-267.

Lazare, S. S., Wojtowicz, E. E., Bystrykh, L. V. and de Haan, G. (2014). "microRNAs in hematopoiesis." Exp Cell Res **329** (2) : 234-238.

- Le Grand, J. N., Chakrama, F. Z., Seguin-Py, S., Fraichard, A., Delage-Mourroux, R., Jouvenot, M. and Boyer-Guittaut, M. (2011). "GABARAPL1 (GEC1): original or copycat?" Autophagy **7** (10) : 1098-1107.
- Lebrec, H., Ponce, R., Preston, B. D., Iles, J., Born, T. L. and Hooper, M. (2015). "Tumor necrosis factor, tumor necrosis factor inhibition, and cancer risk." Curr Med Res Opin **31** (3) : 557-574.
- Lee, S. H., Crocker, P. R., Westaby, S., Key, N., Mason, D. Y., Gordon, S. and Weatherall, D. J. (1988). "Isolation and immunocytochemical characterization of human bone marrow stromal macrophages in hemopoietic clusters." J Exp Med **168** (3) : 1193-1198.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H. and Kim, V. N. (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." EMBO J **23** (20) : 4051-4060.
- Lee, Y. K. and Lee, J. A. (2016). "Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy." BMB Rep **49** (8) : 424-430.
- Legler, D. F., Micheau, O., Doucey, M. A., Tschopp, J. and Bron, C. (2003). "Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation." Immunity **18** (5) : 655-664.
- Leimberg, M. J., Prus, E., Konijn, A. M. and Fibach, E. (2008). "Macrophages function as a ferritin iron source for cultured human erythroid precursors." J Cell Biochem **103** (4) : 1211-1218.
- Leseux, L., Laurent, G., Laurent, C., Rigo, M., Blanc, A., Olive, D. and Bezombes, C. (2008). "PKC zeta mTOR pathway: a new target for rituximab therapy in follicular lymphoma." Blood **111** (1) : 285-291.
- Letting, D. L., Chen, Y. Y., Rakowski, C., Reedy, S. and Blobel, G. A. (2004). "Context-dependent regulation of GATA-1 by friend of GATA-1." Proc Natl Acad Sci U S A **101** (2) : 476-481.
- Leyland-Jones, B., Bondarenko, I., Nemsadze, G., Smirnov, V., Litvin, I., Kokhraidze, I., Abshilava, L., Janjalia, M., Li, R., Lakshmaiah, K. C., *et al.* (2016). "A Randomized, Open-Label, Multicenter, Phase III Study of Epoetin Alfa Versus Best Standard of Care in Anemic Patients With Metastatic Breast Cancer Receiving Standard Chemotherapy." J Clin Oncol **34** (11) : 1197-1207.
- Li, J., Hale, J., Bhagia, P., Xue, F., Chen, L., Jaffray, J., Yan, H., Lane, J., Gallagher, P. G., Mohandas, N., *et al.* (2014). "Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors: BFU-E and CFU-E." Blood **124** (24) : 3636-3645.
- Li, J. and Yuan, J. (2008). "Caspases in apoptosis and beyond." Oncogene **27** (48) : 6194-6206.

Li, W. W., Li, J. and Bao, J. K. (2012). "Microautophagy: lesser-known self-eating." Cell Mol Life Sci **69** (7) : 1125-1136.

Liang, C., Lee, J. S., Inn, K. S., Gack, M. U., Li, Q., Roberts, E. A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., *et al.* (2008). "Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking." Nat Cell Biol **10** (7) : 776-787.

Ling, K. W., Ottersbach, K., van Hamburg, J. P., Oziemlak, A., Tsai, F. Y., Orkin, S. H., Ploemacher, R., Hendriks, R. W. and Dzierzak, E. (2004). "GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells." J Exp Med **200** (7) : 871-882.

Littlewood, T. J., Bajetta, E., Nortier, J. W., Vercaemmen, E., Rapoport, B. and Epoetin Alfa Study, G. (2001). "Effects of epoetin alfa on hematologic parameters and quality of life in cancer patients receiving nonplatinum chemotherapy: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." J Clin Oncol **19** (11) : 2865-2874.

Liu, J. J., Hou, S. C. and Shen, C. K. (2003). "Erythroid gene suppression by NF-kappa B." J Biol Chem **278** (21) : 19534-19540.

Liu, X., Ren, K., Suo, R., Xiong, S. L., Zhang, Q. H., Mo, Z. C., Tang, Z. L., Jiang, Y., Peng, X. S. and Yi, G. H. (2016). "ApoA-I induces S1P release from endothelial cells through ABCA1 and SR-BI in a positive feedback manner." J Physiol Biochem **72** (4) : 657-667.

Love, P. E., Warzecha, C. and Li, L. (2014). "Ldb1 complexes: the new master regulators of erythroid gene transcription." Trends Genet **30** (1) : 1-9.

Lowrey, C. H., Bodine, D. M. and Nienhuis, A. W. (1992). "Mechanism of DNase I hypersensitive site formation within the human globin locus control region." Proc Natl Acad Sci U S A **89** (3) : 1143-1147.

Lozano, J., Berra, E., Municio, M. M., Diaz-Meco, M. T., Dominguez, I., Sanz, L. and Moscat, J. (1994). "Protein kinase C zeta isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase." J Biol Chem **269** (30) : 19200-19202.

Luberto, C., Hassler, D. F., Signorelli, P., Okamoto, Y., Sawai, H., Boros, E., Hazen-Martin, D. J., Obeid, L. M., Hannun, Y. A. and Smith, G. K. (2002). "Inhibition of tumor necrosis factor-induced cell death in MCF7 by a novel inhibitor of neutral sphingomyelinase." J Biol Chem **277** (43) : 41128-41139.

Lucas, T. F., Lazari, M. F. and Porto, C. S. (2014). "Differential role of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 on the regulation of proteins involved with proliferation and differentiation of Sertoli cells from 15-day-old rats." Mol Cell Endocrinol **382** (1) : 84-96.

- Lui, J. C. and Kong, S. K. (2006). "Erythropoietin activates caspase-3 and downregulates CAD during erythroid differentiation in TF-1 cells - a protection mechanism against DNA fragmentation." FEBS Lett **580** (8) : 1965-1970.
- Lulli, V., Romania, P., Morsilli, O., Cianciulli, P., Gabbianelli, M., Testa, U., Giuliani, A. and Marziali, G. (2013). "MicroRNA-486-3p regulates gamma-globin expression in human erythroid cells by directly modulating BCL11A." PLoS One **8** (4) : e60436.
- Lurie, L. J., Boyer, M. E., Grass, J. A. and Bresnick, E. H. (2008). "Differential GATA factor stabilities: implications for chromatin occupancy by structurally similar transcription factors." Biochemistry **47** (3) : 859-869.
- MacEwan, D. J. (2002). "TNF ligands and receptors--a matter of life and death." Br J Pharmacol **135** (4) : 855-875.
- Maceyka, M. and Spiegel, S. (2014). "Sphingolipid metabolites in inflammatory disease." Nature **510** (7503) : 58-67.
- Maddens, S., Charruyer, A., Plo, I., Dubreuil, P., Berger, S., Salles, B., Laurent, G. and Jaffrezou, J. P. (2002). "Kit signaling inhibits the sphingomyelin-ceramide pathway through PLC gamma 1: implication in stem cell factor radioprotective effect." Blood **100** (4) : 1294-1301.
- Mandon, E. C., Ehses, I., Rother, J., van Echten, G. and Sandhoff, K. (1992). "Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver." J Biol Chem **267** (16) : 11144-11148.
- Manning, L. R., Russell, J. E., Padovan, J. C., Chait, B. T., Popowicz, A., Manning, R. S. and Manning, J. M. (2007). "Human embryonic, fetal, and adult hemoglobins have different subunit interface strengths. Correlation with lifespan in the red cell." Protein Sci **16** (8) : 1641-1658.
- Manwani, D. and Bieker, J. J. (2008). "The erythroblastic island." Curr Top Dev Biol **82** 23-53.
- Mao, C. and Obeid, L. M. (2008). "Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate." Biochim Biophys Acta **1781** (9) : 424-434.
- Marino, V. J. and Roguin, L. P. (2008). "The granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) activates Jak/STAT and MAPK pathways in a trophoblastic cell line." J Cell Biochem **103** (5) : 1512-1523.
- Martelli, A. M., Evangelisti, C., Chiarini, F., Grimaldi, C., Cappellini, A., Ognibene, A. and McCubrey, J. A. (2010). "The emerging role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling network in normal myelopoiesis and leukemogenesis." Biochim Biophys Acta **1803** (9) : 991-1002.

- Masaki, S., Ohtsuka, R., Abe, Y., Muta, K. and Umemura, T. (2007). "Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human erythropoiesis." Biochem Biophys Res Commun **364** (3) : 509-514.
- Masoud, G. N. and Li, W. (2015). "HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy." Acta Pharm Sin B **5** (5) : 378-389.
- Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., *et al.* (2009). "Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages." Nat Cell Biol **11** (4) : 385-396.
- Mauthe, M., Jacob, A., Freiberger, S., Hentschel, K., Stierhof, Y. D., Codogno, P. and Proikas-Cezanne, T. (2011). "Resveratrol-mediated autophagy requires WIPI-1-regulated LC3 lipidation in the absence of induced phagophore formation." Autophagy **7** (12) : 1448-1461.
- McCranor, B. J., Kim, M. J., Cruz, N. M., Xue, Q. L., Berger, A. E., Walston, J. D., Civin, C. I. and Roy, C. N. (2014). "Interleukin-6 directly impairs the erythroid development of human TF-1 erythroleukemic cells." Blood Cells Mol Dis **52** (2-3) : 126-133.
- Means, R. T., Jr., Dessypris, E. N. and Krantz, S. B. (1992). "Inhibition of human erythroid colony-forming units by interleukin-1 is mediated by gamma interferon." J Cell Physiol **150** (1) : 59-64.
- Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I. and Codogno, P. (2010). "Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells." Cell Res **20** (7) : 748-762.
- Mendelson, A. and Frenette, P. S. (2014). "Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration." Nat Med **20** (8) : 833-846.
- Mercer, C. A., Kaliappan, A. and Dennis, P. B. (2009). "A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy." Autophagy **5** (5) : 649-662.
- Merika, M. and Orkin, S. H. (1993). "DNA-binding specificity of GATA family transcription factors." Mol Cell Biol **13** (7) : 3999-4010.
- Merika, M. and Orkin, S. H. (1995). "Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF." Mol Cell Biol **15** (5) : 2437-2447.
- Metcalf, D. and Isaacs, A. M. (2010). "The role of ESCRT proteins in fusion events involving lysosomes, endosomes and autophagosomes." Biochem Soc Trans **38** (6) : 1469-1473.
- Miccio, A., Wang, Y., Hong, W., Gregory, G. D., Wang, H., Yu, X., Choi, J. K., Shelat, S., Tong, W., Poncz, M., *et al.* (2010). "NuRD mediates activating and

repressive functions of GATA-1 and FOG-1 during blood development." EMBO J **29** (2) : 442-456.

Mignotte, V., Wall, L., deBoer, E., Grosveld, F. and Romeo, P. H. (1989). "Two tissue-specific factors bind the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene." Nucleic Acids Res **17** (1) : 37-54.

Mijaljica, D., Prescott, M. and Devenish, R. J. (2011). "V-ATPase engagement in autophagic processes." Autophagy **7** (6) : 666-668.

Milhas, D., Clarke, C. J. and Hannun, Y. A. (2010). "Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: implications for bioactive sphingolipids." FEBS Lett **584** (9) : 1887-1894.

Miller, L. L., Miller, S. C., Torti, S. V., Tsuji, Y. and Torti, F. M. (1991). "Iron-independent induction of ferritin H chain by tumor necrosis factor." Proc Natl Acad Sci U S A **88** (11) : 4946-4950.

Miranda, M. B. and Johnson, D. E. (2007). "Signal transduction pathways that contribute to myeloid differentiation." Leukemia **21** (7) : 1363-1377.

Miranda, M. B., McGuire, T. F. and Johnson, D. E. (2002). "Importance of MEK-1/-2 signaling in monocytic and granulocytic differentiation of myeloid cell lines." Leukemia **16** (4) : 683-692.

Mitoma, H., Horiuchi, T., Tsukamoto, H., Tamimoto, Y., Kimoto, Y., Uchino, A., To, K., Harashima, S., Hatta, N. and Harada, M. (2008). "Mechanisms for cytotoxic effects of anti-tumor necrosis factor agents on transmembrane tumor necrosis factor alpha-expressing cells: comparison among infliximab, etanercept, and adalimumab." Arthritis Rheum **58** (5) : 1248-1257.

Mittal, N., Malpani, S., Dyson, M., Ono, M., Coon, J. S., Kim, J. J., Schink, J. C., Bulun, S. E. and Pavone, M. E. (2014). "Fenretinide: a novel treatment for endometrial cancer." PLoS One **9** (10) : e110410.

Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M. and Ohsumi, Y. (1998). "A protein conjugation system essential for autophagy." Nature **395** (6700) : 395-398.

Mizutani, N., Kobayashi, M., Sobue, S., Ichihara, M., Ito, H., Tanaka, K., Iwaki, S., Fujii, S., Ito, Y., Tamiya-Koizumi, K., *et al.* (2013). "Sphingosine kinase 1 expression is downregulated during differentiation of Friend cells due to decreased c-MYB." Biochim Biophys Acta **1833** (5) : 1006-1016.

Mizutani, Y., Kihara, A. and Igarashi, Y. (2005). "Mammalian Lass6 and its related family members regulate synthesis of specific ceramides." Biochem J **390** (Pt 1) : 263-271.

Mocellin, S., Rossi, C. R., Pilati, P. and Nitti, D. (2005). "Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy." Cytokine Growth Factor Rev **16** (1) : 35-53.

Mohandas, N. and Prenant, M. (1978). "Three-dimensional model of bone marrow." Blood **51** (4) : 633-643.

Moldawer, L. L., Marano, M. A., Wei, H., Fong, Y., Silen, M. L., Kuo, G., Manogue, K. R., Vlassara, H., Cohen, H., Cerami, A., *et al.* (1989). "Cachectin/tumor necrosis factor-alpha alters red blood cell kinetics and induces anemia in vivo." FASEB J **3** (5) : 1637-1643.

Morad, S. A. and Cabot, M. C. (2013). "Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells." Nat Rev Cancer **13** (1) : 51-65.

Morceau, F., Aries, A., Lahlil, R., Devy, L., Jardillier, J. C., Jeannesson, P. and Trentesaux, C. (1996a). "Evidence for distinct regulation processes in the aclacinomycin- and doxorubicin-mediated differentiation of human erythroleukemic cells." Biochem Pharmacol **51** (6) : 839-845.

Morceau, F., Chenais, B., Gillet, R., Jardillier, J. C., Jeannesson, P. and Trentesaux, C. (1996b). "Transcriptional and posttranscriptional regulation of erythroid gene expression in anthracycline-induced differentiation of human erythroleukemic cells." Cell Growth Differ **7** (8) : 1023-1029.

Morceau, F., Dicato, M. and Diederich, M. (2009). "Pro-inflammatory cytokine-mediated anemia: regarding molecular mechanisms of erythropoiesis." Mediators Inflamm **2009** 405016.

Morceau, F., Schnekenburger, M., Blasius, R., Buck, I., Dicato, M. and Diederich, M. (2006). "Tumor necrosis factor alpha inhibits aclacinomycin A-induced erythroid differentiation of K562 cells via GATA-1." Cancer Lett **240** (2) : 203-212.

Morceau, F., Schnekenburger, M., Dicato, M. and Diederich, M. (2004). "GATA-1: friends, brothers, and coworkers." Ann N Y Acad Sci **1030** 537-554.

Morrison, S. J. and Scadden, D. T. (2014). "The bone marrow niche for haematopoietic stem cells." Nature **505** (7483) : 327-334.

Mortensen, M., Ferguson, D. J., Edelmann, M., Kessler, B., Morten, K. J., Komatsu, M. and Simon, A. K. (2010). "Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **107** (2) : 832-837.

Mortensen, M., Soilleux, E. J., Djordjevic, G., Tripp, R., Lutteropp, M., Sadighi-Akha, E., Stranks, A. J., Glanville, J., Knight, S., Jacobsen, S. E., *et al.* (2011a). "The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance." J Exp Med **208** (3) : 455-467.



Mortensen, M., Watson, A. S. and Simon, A. K. (2011b). "Lack of autophagy in the hematopoietic system leads to loss of hematopoietic stem cell function and dysregulated myeloid proliferation." Autophagy **7** (9) : 1069-1070.

Muller, G., Storz, P., Bourteele, S., Doppler, H., Pfizenmaier, K., Mischak, H., Philipp, A., Kaiser, C. and Kolch, W. (1998). "Regulation of Raf-1 kinase by TNF via its second messenger ceramide and cross-talk with mitogenic signalling." EMBO J **17** (3) : 732-742.

Muller-Sieburg, C. E., Cho, R. H., Thoman, M., Adkins, B. and Sieburg, H. B. (2002). "Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation." Blood **100** (4) : 1302-1309.

Muntean, A. G. and Crispino, J. D. (2005). "Differential requirements for the activation domain and FOG-interaction surface of GATA-1 in megakaryocyte gene expression and development." Blood **106** (4) : 1223-1231.

Murate, T., Saga, S., Hotta, T., Asano, H., Ito, T., Kato, K., Tsushita, K., Kinoshita, T., Ichikawa, A., Yoshida, S., *et al.* (1993). "The close relationship between DNA replication and the selection of differentiation lineages of human erythroleukemia cell lines K562, HEL, and TF1 into either erythroid or megakaryocytic lineages." Exp Cell Res **208** (1) : 35-43.

Murate, T., Suzuki, M., Hattori, M., Takagi, A., Kojima, T., Tanizawa, T., Asano, H., Hotta, T., Saito, H., Yoshida, S., *et al.* (2002). "Up-regulation of acid sphingomyelinase during retinoic acid-induced myeloid differentiation of NB4, a human acute promyelocytic leukemia cell line." J Biol Chem **277** (12) : 9936-9943.

Murre, C. (2007). "Defining the pathways of early adult hematopoiesis." Cell Stem Cell **1** (4) : 357-358.

Nakamura, N., Matsuura, A., Wada, Y. and Ohsumi, Y. (1997). "Acidification of vacuoles is required for autophagic degradation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*." J Biochem **121** (2) : 338-344.

Nakamura, S. and Yoshimori, T. (2017). "New insights into autophagosome-lysosome fusion." J Cell Sci **130** (7) : 1209-1216.

Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B. K. and Ganz, T. (2004a). "IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin." J Clin Invest **113** (9) : 1271-1276.

Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., Ganz, T. and Kaplan, J. (2004b). "Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization." Science **306** (5704) : 2090-2093.

Nerlov, C., Querfurth, E., Kulesa, H. and Graf, T. (2000). "GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription." Blood **95** (8) : 2543-2551.

- Newton, J., Lima, S., Maceyka, M. and Spiegel, S. (2015). "Revisiting the sphingolipid rheostat: Evolving concepts in cancer therapy." Exp Cell Res **333** (2) : 195-200.
- Nichols, K. E., Crispino, J. D., Poncz, M., White, J. G., Orkin, S. H., Maris, J. M. and Weiss, M. J. (2000). "Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1." Nat Genet **24** (3) : 266-270.
- Noda, T., Matsunaga, K., Taguchi-Atarashi, N. and Yoshimori, T. (2010). "Regulation of membrane biogenesis in autophagy via PI3P dynamics." Semin Cell Dev Biol **21** (7) : 671-676.
- Noda, T. and Ohsumi, Y. (1998). "Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast." J Biol Chem **273** (7) : 3963-3966.
- Nouri, M., Deezagi, A. and Ebrahimi, M. (2016). "Reprogramming of human peripheral blood monocytes to erythroid lineage by blocking of the PU-1 gene expression." Ann Hematol **95** (4) : 549-556.
- Novak, I., Kirkin, V., McEwan, D. G., Zhang, J., Wild, P., Rozenknop, A., Rogov, V., Lohr, F., Popovic, D., Occhipinti, A., *et al.* (2010). "Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance." EMBO Rep **11** (1) : 45-51.
- Nuez, B., Michalovich, D., Bygrave, A., Ploemacher, R. and Grosveld, F. (1995). "Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLf gene." Nature **375** (6529) : 316-318.
- Nyberg, L., Duan, R. D., Axelson, J. and Nilsson, A. (1996). "Identification of an alkaline sphingomyelinase activity in human bile." Biochim Biophys Acta **1300** (1) : 42-48.
- O'Connell, R. M., Taganov, K. D., Boldin, M. P., Cheng, G. and Baltimore, D. (2007). "MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response." Proc Natl Acad Sci U S A **104** (5) : 1604-1609.
- O'Neill, S. M., Yun, J. K., Fox, T. E. and Kester, M. (2011). "Transcriptional regulation of the human neutral ceramidase gene." Arch Biochem Biophys **511** (1-2) : 21-30.
- Obeid, L. M., Linardic, C. M., Karolak, L. A. and Hannun, Y. A. (1993). "Programmed cell death induced by ceramide." Science **259** (5102) : 1769-1771.
- Ohneda, K., Shimizu, R., Nishimura, S., Muraosa, Y., Takahashi, S., Engel, J. D. and Yamamoto, M. (2002). "A minigene containing four discrete cis elements recapitulates GATA-1 gene expression in vivo." Genes Cells **7** (12) : 1243-1254.
- Okazaki, T., Bell, R. M. and Hannun, Y. A. (1989). "Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation." J Biol Chem **264** (32) : 19076-19080.

Okazaki, T., Bielawska, A., Bell, R. M. and Hannun, Y. A. (1990). "Role of ceramide as a lipid mediator of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation." J Biol Chem **265** (26) : 15823-15831.

Olivera, A., Rosenfeldt, H. M., Bektas, M., Wang, F., Ishii, I., Chun, J., Milstien, S. and Spiegel, S. (2003). "Sphingosine kinase type 1 induces G12/13-mediated stress fiber formation, yet promotes growth and survival independent of G protein-coupled receptors." J Biol Chem **278** (47) : 46452-46460.

Orfali, N., O'Donovan, T. R., Nyhan, M. J., Britschgi, A., Tschan, M. P., Cahill, M. R., Mongan, N. P., Gudas, L. J. and McKenna, S. L. (2015). "Induction of autophagy is a key component of all-trans-retinoic acid-induced differentiation in leukemia cells and a potential target for pharmacologic modulation." Exp Hematol **43** (9) : 781-793 e782.

Orkin, S. H. (1995). "Transcription factors and hematopoietic development." J Biol Chem **270** (10) : 4955-4958.

Orkin, S. H. and Zon, L. I. (2008). "Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology." Cell **132** (4) : 631-644.

Osawa, Y., Uchinami, H., Bielawski, J., Schwabe, R. F., Hannun, Y. A. and Brenner, D. A. (2005). "Roles for C16-ceramide and sphingosine 1-phosphate in regulating hepatocyte apoptosis in response to tumor necrosis factor-alpha." J Biol Chem **280** (30) : 27879-27887.

Otomo, C., Metlagel, Z., Takaesu, G. and Otomo, T. (2013). "Structure of the human ATG12~ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy." Nat Struct Mol Biol **20** (1) : 59-66.

Pahl, H. L., Scheibe, R. J., Zhang, D. E., Chen, H. M., Galson, D. L., Maki, R. A. and Tenen, D. G. (1993). "The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter." J Biol Chem **268** (7) : 5014-5020.

Pal, S., Cantor, A. B., Johnson, K. D., Moran, T. B., Boyer, M. E., Orkin, S. H. and Bresnick, E. H. (2004). "Coregulator-dependent facilitation of chromatin occupancy by GATA-1." Proc Natl Acad Sci U S A **101** (4) : 980-985.

Palma, C. A., Tonna, E. J., Ma, D. F. and Lutherborrow, M. A. (2012). "MicroRNA control of myelopoiesis and the differentiation block in acute myeloid leukaemia." J Cell Mol Med **16** (5) : 978-987.

Papayannopoulou, T., Nakamoto, B., Kurachi, S., Tweeddale, M. and Messner, H. (1988). "Surface antigenic profile and globin phenotype of two new human erythroleukemia lines: characterization and interpretations." Blood **72** (3) : 1029-1038.

Parameswaran, N. and Patial, S. (2010). "Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **20** (2) : 87-103.

- Pase, L., Layton, J. E., Kloosterman, W. P., Carradice, D., Waterhouse, P. M. and Lieschke, G. J. (2009). "miR-451 regulates zebrafish erythroid maturation in vivo via its target gata2." Blood **113** (8) : 1794-1804.
- Patmanathan, S. N., Wang, W., Yap, L. F., Herr, D. R. and Paterson, I. C. (2017). "Mechanisms of sphingosine 1-phosphate receptor signalling in cancer." Cell Signal **34** 66-75.
- Patrinos, G. P., de Krom, M., de Boer, E., Langeveld, A., Imam, A. M., Strouboulis, J., de Laat, W. and Grosveld, F. G. (2004). "Multiple interactions between regulatory regions are required to stabilize an active chromatin hub." Genes Dev **18** (12) : 1495-1509.
- Paugh, B. S., Bryan, L., Paugh, S. W., Wilczynska, K. M., Alvarez, S. M., Singh, S. K., Kapitonov, D., Rokita, H., Wright, S., Griswold-Prenner, I., *et al.* (2009). "Interleukin-1 regulates the expression of sphingosine kinase 1 in glioblastoma cells." J Biol Chem **284** (6) : 3408-3417.
- Pchejetski, D., Nunes, J., Coughlan, K., Lall, H., Pitson, S. M., Waxman, J. and Sumbayev, V. V. (2011). "The involvement of sphingosine kinase 1 in LPS-induced Toll-like receptor 4-mediated accumulation of HIF-1alpha protein, activation of ASK1 and production of the pro-inflammatory cytokine IL-6." Immunol Cell Biol **89** (2) : 268-274.
- Petit, I., Szyper-Kravitz, M., Nagler, A., Lahav, M., Peled, A., Habler, L., Ponomaryov, T., Taichman, R. S., Arenzana-Seisdedos, F., Fujii, N., *et al.* (2002). "G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4." Nat Immunol **3** (7) : 687-694.
- Pettus, B. J., Chalfant, C. E. and Hannun, Y. A. (2002). "Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives." Biochim Biophys Acta **1585** (2-3) : 114-125.
- Pietras, E. M., Mirantes-Barbeito, C., Fong, S., Loeffler, D., Kovtonyuk, L. V., Zhang, S., Lakshminarasimhan, R., Chin, C. P., Techner, J. M., Will, B., *et al.* (2016). "Chronic interleukin-1 exposure drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal." Nat Cell Biol **18** (6) : 607-618.
- Pillay, J., Tak, T., Kamp, V. M. and Koenderman, L. (2013). "Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences." Cell Mol Life Sci **70** (20) : 3813-3827.
- Pina, C. and Enver, T. (2007). "Differential contributions of haematopoietic stem cells to foetal and adult haematopoiesis: insights from functional analysis of transcriptional regulators." Oncogene **26** (47) : 6750-6765.
- Pitson, S. M., Moretti, P. A., Zebol, J. R., Lynn, H. E., Xia, P., Vadas, M. A. and Wattenberg, B. W. (2003). "Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation." EMBO J **22** (20) : 5491-5500.

- Plummer, G., Perreault, K. R., Holmes, C. F. and Posse De Chaves, E. I. (2005). "Activation of serine/threonine protein phosphatase-1 is required for ceramide-induced survival of sympathetic neurons." Biochem J **385** (Pt 3) : 685-693.
- Polson, H. E., de Lartigue, J., Rigden, D. J., Reedijk, M., Urbe, S., Clague, M. J. and Tooze, S. A. (2010). "Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation." Autophagy **6** (4) : 506-522.
- Ponka, P. (1997). "Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells." Blood **89** (1) : 1-25.
- Pretorius, E., du Plooy, J. N. and Bester, J. (2016). "A Comprehensive Review on Eryptosis." Cell Physiol Biochem **39** (5) : 1977-2000.
- Proikas-Cezanne, T. and Codogno, P. (2011). "Beclin 1 or not Beclin 1." Autophagy **7** (7) : 671-672.
- Proikas-Cezanne, T., Takacs, Z., Donnes, P. and Kohlbacher, O. (2015). "WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome." J Cell Sci **128** (2) : 207-217.
- Pyne, S., Lee, S. C., Long, J. and Pyne, N. J. (2009). "Role of sphingosine kinases and lipid phosphate phosphatases in regulating spatial sphingosine 1-phosphate signalling in health and disease." Cell Signal **21** (1) : 14-21.
- Rahmanian, M., Curley, R. W., Jr., Obeid, L. M., Hannun, Y. A. and Kravetka, J. M. (2011). "Identification of dihydroceramide desaturase as a direct in vitro target for fenretinide." J Biol Chem **286** (28) : 24754-24764.
- Rankin, E. B., Wu, C., Khatri, R., Wilson, T. L., Andersen, R., Araldi, E., Rankin, A. L., Yuan, J., Kuo, C. J., Schipani, E., *et al.* (2012). "The HIF signaling pathway in osteoblasts directly modulates erythropoiesis through the production of EPO." Cell **149** (1) : 63-74.
- Rasmussen, K. D., Simmini, S., Abreu-Goodger, C., Bartonicek, N., Di Giacomo, M., Bilbao-Cortes, D., Horos, R., Von Lindern, M., Enright, A. J. and O'Carroll, D. (2010). "The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis." J Exp Med **207** (7) : 1351-1358.
- Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C. and Rubinsztein, D. C. (2010). "Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures." Nat Cell Biol **12** (8) : 747-757.
- Reggiori, F. and Tooze, S. A. (2012). "Autophagy regulation through Atg9 traffic." J Cell Biol **198** (2) : 151-153.
- Rekhtman, N., Radparvar, F., Evans, T. and Skoultchi, A. I. (1999). "Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells." Genes Dev **13** (11) : 1398-1411.

Ren, M., Xu, G., Zeng, J., De Lemos-Chiarandini, C., Adesnik, M. and Sabatini, D. D. (1998). "Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **95** (11) : 6187-6192.

Reyes, J. G., Robayna, I. G., Delgado, P. S., Gonzalez, I. H., Aguiar, J. Q., Rosas, F. E., Fanjul, L. F. and Galarreta, C. M. (1996). "c-Jun is a downstream target for ceramide-activated protein phosphatase in A431 cells." J Biol Chem **271** (35) : 21375-21380.

Ribeil, J. A., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Cathelin, S., Kersual, J., Dussiot, M., Coulon, S., Moura, I. C., Zeuner, A., Kirkegaard-Sorensen, T., *et al.* (2007). "Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1." Nature **445** (7123) : 102-105.

Ribeiro, D. M. and Sonati, M. F. (2008). "Regulation of human alpha-globin gene expression and alpha-thalassemia." Genet Mol Res **7** (4) : 1045-1053.

Rieske, P. and Pongubala, J. M. (2001). "AKT induces transcriptional activity of PU.1 through phosphorylation-mediated modifications within its transactivation domain." J Biol Chem **276** (11) : 8460-8468.

Riffelmacher, T., Clarke, A., Richter, F. C., Stranks, A., Pandey, S., Danielli, S., Hublitz, P., Yu, Z., Johnson, E., Schwerd, T., *et al.* (2017). "Autophagy-Dependent Generation of Free Fatty Acids Is Critical for Normal Neutrophil Differentiation." Immunity **47** (3) : 466-480 e465.

Robb, L. (2007). "Cytokine receptors and hematopoietic differentiation." Oncogene **26** (47) : 6715-6723.

Roodman, G. D., Johnson, R. A. and Clibon, U. (1989). "Tumor necrosis factor alpha and the anemia of chronic disease: effects of chronic exposure to TNF on erythropoiesis in vivo." Adv Exp Med Biol **271** 185-196.

Ropolo, A., Grasso, D., Pardo, R., Sacchetti, M. L., Archange, C., Lo Re, A., Seux, M., Nowak, J., Gonzalez, C. D., Iovanna, J. L., *et al.* (2007). "The pancreatitis-induced vacuole membrane protein 1 triggers autophagy in mammalian cells." J Biol Chem **282** (51) : 37124-37133.

Rosen, H., Stevens, R. C., Hanson, M., Roberts, E. and Oldstone, M. B. (2013). "Sphingosine-1-phosphate and its receptors: structure, signaling, and influence." Annu Rev Biochem **82** 637-662.

Ross, I. L., Yue, X., Ostrowski, M. C. and Hume, D. A. (1998). "Interaction between PU.1 and another Ets family transcription factor promotes macrophage-specific Basal transcription initiation." J Biol Chem **273** (12) : 6662-6669.

- Rozman, S., Yousefi, S., Oberson, K., Kaufmann, T., Benarafa, C. and Simon, H. U. (2015). "The generation of neutrophils in the bone marrow is controlled by autophagy." Cell Death Differ **22** (3) : 445-456.
- Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y. Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T. P., Dillin, A. and Guan, K. L. (2013). "ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase." Nat Cell Biol **15** (7) : 741-750.
- Rusten, L. S. and Jacobsen, S. E. (1995). "Tumor necrosis factor (TNF)-alpha directly inhibits human erythropoiesis in vitro: role of p55 and p75 TNF receptors." Blood **85** (4) : 989-996.
- Rusten, T. E., Vaccari, T., Lindmo, K., Rodahl, L. M., Nezis, I. P., Sem-Jacobsen, C., Wendler, F., Vincent, J. P., Brech, A., Bilder, D., *et al.* (2007). "ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy." Curr Biol **17** (20) : 1817-1825.
- Saftig, P., Beertsen, W. and Eskelinen, E. L. (2008). "LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation." Autophagy **4** (4) : 510-512.
- Sandoval, H., Thiagarajan, P., Dasgupta, S. K., Schumacher, A., Prchal, J. T., Chen, M. and Wang, J. (2008). "Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells." Nature **454** (7201) : 232-235.
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D. M. (2004). "Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton." Curr Biol **14** (14) : 1296-1302.
- Sato, N., Sakamaki, K., Terada, N., Arai, K. and Miyajima, A. (1993). "Signal transduction by the high-affinity GM-CSF receptor: two distinct cytoplasmic regions of the common beta subunit responsible for different signaling." EMBO J **12** (11) : 4181-4189.
- Sato, S., Fujita, N. and Tsuruo, T. (2000). "Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90." Proc Natl Acad Sci U S A **97** (20) : 10832-10837.
- Scarlatti, F., Bauvy, C., Ventruti, A., Sala, G., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., Ghidoni, R. and Codogno, P. (2004). "Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1." J Biol Chem **279** (18) : 18384-18391.
- Schaaf, M. B., Keulers, T. G., Vooijs, M. A. and Rouschop, K. M. (2016). "LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions." FASEB J **30** (12) : 3961-3978.
- Schneider, P. B. and Kennedy, E. P. (1967). "Sphingomyelinase in normal human spleens and in spleens from subjects with Niemann-Pick disease." J Lipid Res **8** (3) : 202-209.

Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschwender, M., Adam, D., *et al.* (2004). "Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles." *Immunity* **21** (3) : 415-428.

Schuchman, E. H., Levrán, O., Pereira, L. V. and Desnick, R. J. (1992). "Structural organization and complete nucleotide sequence of the gene encoding human acid sphingomyelinase (SMPD1)." *Genomics* **12** (2) : 197-205.

Schutze, S., Machleidt, T. and Kronke, M. (1994). "The role of diacylglycerol and ceramide in tumor necrosis factor and interleukin-1 signal transduction." *J Leukoc Biol* **56** (5) : 533-541.

Schutze, S., Potthoff, K., Machleidt, T., Berkovic, D., Wiegmann, K. and Kronke, M. (1992). "TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown." *Cell* **71** (5) : 765-776.

Schutze, S., Tchikov, V. and Schneider-Brachert, W. (2008). "Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9** (8) : 655-662.

Schweers, R. L., Zhang, J., Randall, M. S., Loyd, M. R., Li, W., Dorsey, F. C., Kundu, M., Opferman, J. T., Cleveland, J. L., Miller, J. L., *et al.* (2007). "NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (49) : 19500-19505.

Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J. and Singh, H. (1994). "Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages." *Science* **265** (5178) : 1573-1577.

Seggewiss, R. and Einsele, H. (2010). "Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update." *Blood* **115** (19) : 3861-3868.

Sentelle, R. D., Senkal, C. E., Jiang, W., Ponnusamy, S., Gencer, S., Selvam, S. P., Ramshesh, V. K., Peterson, Y. K., Lemasters, J. J., Szulc, Z. M., *et al.* (2012). "Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy." *Nat Chem Biol* **8** (10) : 831-838.

Sessler, T., Healy, S., Samali, A. and Szegezdi, E. (2013). "Structural determinants of DISC function: new insights into death receptor-mediated apoptosis signalling." *Pharmacol Ther* **140** (2) : 186-199.

Sewter, C. P., Digby, J. E., Blows, F., Prins, J. and O'Rahilly, S. (1999). "Regulation of tumour necrosis factor-alpha release from human adipose tissue in vitro." *J Endocrinol* **163** (1) : 33-38.

Shaham, L., Vendramini, E., Ge, Y., Goren, Y., Birger, Y., Tijssen, M. R., McNulty, M., Geron, I., Schwartzman, O., Goldberg, L., *et al.* (2015). "MicroRNA-486-5p is an



erythroid oncomiR of the myeloid leukemias of Down syndrome." Blood **125** (8) : 1292-1301.

Shamseddine, A. A., Airola, M. V. and Hannun, Y. A. (2015). "Roles and regulation of neutral sphingomyelinase-2 in cellular and pathological processes." Adv Biol Regul **57** 24-41.

Sharpless, N. E. and DePinho, R. A. (2007). "How stem cells age and why this makes us grow old." Nat Rev Mol Cell Biol **8** (9) : 703-713.

Sheedy, F. J. and O'Neill, L. A. (2008). "Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation." Ann Rheum Dis **67 Suppl 3** iii50-55.

Sheng, X., Zhong, H., Wan, H., Zhong, J. and Chen, F. (2016). "Granulocyte colony-stimulating factor inhibits CXCR4/SDF-1alpha signaling and overcomes stromal-mediated drug resistance in the HL-60 cell line." Exp Ther Med **12** (1) : 396-404.

Shi, L., Lin, Y. H., Sierant, M. C., Zhu, F., Cui, S., Guan, Y., Sartor, M. A., Tanabe, O., Lim, K. C. and Engel, J. D. (2014). "Developmental transcriptome analysis of human erythropoiesis." Hum Mol Genet **23** (17) : 4528-4542.

Shi, X. F., Wang, H., Kong, F. X., Xu, Q. Q., Xiao, F. J., Yang, Y. F., Ge, R. L. and Wang, L. S. (2017). "Exosomal miR-486 regulates hypoxia-induced erythroid differentiation of erythroleukemia cells through targeting Sirt1." Exp Cell Res **351** (1) : 74-81.

Shiao, S. Y., Ou, C. N. and Pierantoni, H. (2006). "The measurement of accurate fetal hemoglobin and related oxygen saturation by the hemoximeter." Clin Chim Acta **374** (1-2) : 75-80.

Shibina, A., Seidel, D., Somanchi, S. S., Lee, D. A., Stermann, A., Maurer, B. J., Lode, H. N., Reynolds, C. P. and Huebener, N. (2013). "Fenretinide sensitizes multidrug-resistant human neuroblastoma cells to antibody-independent and ch14.18-mediated NK cell cytotoxicity." J Mol Med (Berl) **91** (4) : 459-472.

Shimizu, R., Engel, J. D. and Yamamoto, M. (2008). "GATA1-related leukaemias." Nat Rev Cancer **8** (4) : 279-287.

Siatecka, M. and Bieker, J. J. (2011). "The multifunctional role of EKLF/KLF1 during erythropoiesis." Blood **118** (8) : 2044-2054.

Simpson, C. F. and Kling, J. M. (1967). "The mechanism of denucleation in circulating erythroblasts." J Cell Biol **35** (1) : 237-245.

Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., Deberardinis, R. J., Mahmoud, A. I., Olson, E. N., Schneider, J. W., Zhang, C. C. and Sadek, H. A. (2010). "The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche." Cell Stem Cell **7** (3) : 380-390.

Slotte, J. P. (2013). "Biological functions of sphingomyelins." Prog Lipid Res **52** (4) : 424-437.

Smithgall, T. E. (1998). "Signal transduction pathways regulating hematopoietic differentiation." Pharmacol Rev **50** (1) : 1-19.

Sobue, S., Hagiwara, K., Banno, Y., Tamiya-Koizumi, K., Suzuki, M., Takagi, A., Kojima, T., Asano, H., Nozawa, Y. and Murate, T. (2005). "Transcription factor specificity protein 1 (Sp1) is the main regulator of nerve growth factor-induced sphingosine kinase 1 gene expression of the rat pheochromocytoma cell line, PC12." J Neurochem **95** (4) : 940-949.

Sofroniadou, S., Kassimatis, T. and Goldsmith, D. (2010). "Anaemia, microcytosis and sirolimus--is iron the missing link?" Nephrol Dial Transplant **25** (5) : 1667-1675.

Solovic, I., Sester, M., Gomez-Reino, J. J., Rieder, H. L., Ehlers, S., Milburn, H. J., Kampmann, B., Hellmich, B., Groves, R., Schreiber, S., *et al.* (2010). "The risk of tuberculosis related to tumour necrosis factor antagonist therapies: a TBNET consensus statement." Eur Respir J **36** (5) : 1185-1206.

Song, M. S. and Posse de Chaves, E. I. (2003). "Inhibition of rat sympathetic neuron apoptosis by ceramide. Role of p75<sup>NTR</sup> in ceramide generation." Neuropharmacology **45** (8) : 1130-1150.

Souza, L. R., Silva, E., Calloway, E., Cabrera, C. and McLemore, M. L. (2013). "G-CSF activation of AKT is not sufficient to prolong neutrophil survival." J Leukoc Biol **93** (6) : 883-893.

Spiegel, S. and Milstien, S. (2003). "Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid." Nat Rev Mol Cell Biol **4** (5) : 397-407.

Spivak, J. L. (2005). "The anaemia of cancer: death by a thousand cuts." Nat Rev Cancer **5** (7) : 543-555.

Squadrito, M. L., Etzrodt, M., De Palma, M. and Pittet, M. J. (2013). "MicroRNA-mediated control of macrophages and its implications for cancer." Trends Immunol **34** (7) : 350-359.

Stamatoyannopoulos, G. (2005). "Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation." Exp Hematol **33** (3) : 259-271.

Stancevic, B. and Kolesnick, R. (2010). "Ceramide-rich platforms in transmembrane signaling." FEBS Lett **584** (9) : 1728-1740.

Starczynowski, D. T., Kuchenbauer, F., Wegrzyn, J., Rouhi, A., Petriv, O., Hansen, C. L., Humphries, R. K. and Karsan, A. (2011). "MicroRNA-146a disrupts hematopoietic differentiation and survival." Exp Hematol **39** (2) : 167-178 e164.

- Steelman, L. S., Pohnert, S. C., Shelton, J. G., Franklin, R. A., Bertrand, F. E. and McCubrey, J. A. (2004). "JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis." Leukemia **18** (2) : 189-218.
- Stella, C. C., Cazzola, M., De Fabritiis, P., De Vincentiis, A., Gianni, A. M., Lanza, F., Lauria, F., Lemoli, R. M., Tarella, C., Zanon, P., *et al.* (1995). "CD34-positive cells: biology and clinical relevance." Haematologica **80** (4) : 367-387.
- Stirewalt, D. L. and Radich, J. P. (2003). "The role of FLT3 in haematopoietic malignancies." Nat Rev Cancer **3** (9) : 650-665.
- Stopka, T., Amanatullah, D. F., Papetti, M. and Skoultchi, A. I. (2005). "PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure." EMBO J **24** (21) : 3712-3723.
- Subramani, S. and Malhotra, V. (2013). "Non-autophagic roles of autophagy-related proteins." EMBO Rep **14** (2) : 143-151.
- Suda, T., Takubo, K. and Semenza, G. L. (2011). "Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche." Cell Stem Cell **9** (4) : 298-310.
- Sugatani, T. and Hruska, K. A. (2009). "Impaired micro-RNA pathways diminish osteoclast differentiation and function." J Biol Chem **284** (7) : 4667-4678.
- Sugiyama, D., Tanaka, M., Kitajima, K., Zheng, J., Yen, H., Murotani, T., Yamatodani, A. and Nakano, T. (2008). "Differential context-dependent effects of friend of GATA-1 (FOG-1) on mast-cell development and differentiation." Blood **111** (4) : 1924-1932.
- Sukocheva, O. A., Wang, L., Albanese, N., Pitson, S. M., Vadas, M. A. and Xia, P. (2003). "Sphingosine kinase transmits estrogen signaling in human breast cancer cells." Mol Endocrinol **17** (10) : 2002-2012.
- Sun, Q., Zhang, J., Fan, W., Wong, K. N., Ding, X., Chen, S. and Zhong, Q. (2011). "The RUN domain of rubicon is important for hVps34 binding, lipid kinase inhibition, and autophagy suppression." J Biol Chem **286** (1) : 185-191.
- Sun, T., Li, X., Zhang, P., Chen, W. D., Zhang, H. L., Li, D. D., Deng, R., Qian, X. J., Jiao, L., Ji, J., *et al.* (2015). "Acetylation of Beclin 1 inhibits autophagosome maturation and promotes tumour growth." Nat Commun **6** 7215.
- Sun, Y., Peng, R., Peng, H., Liu, H., Wen, L., Wu, T., Yi, H., Li, A. and Zhang, Z. (2016). "miR-451 suppresses the NF-kappaB-mediated proinflammatory molecules expression through inhibiting LMP7 in diabetic nephropathy." Mol Cell Endocrinol **433** 75-86.
- Tachiyama, R., Ishikawa, D., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Yoshimori, T., Yokota, S., Himeno, M., Tanaka, Y. and Fujita, H. (2011). "Proteome of

ubiquitin/MVB pathway: possible involvement of iron-induced ubiquitylation of transferrin receptor in lysosomal degradation." Genes Cells **16** (4) : 448-466.

Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J. and Baltimore, D. (2006). "NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses." Proc Natl Acad Sci U S A **103** (33) : 12481-12486.

Taha, T. A., Kitatani, K., Bielawski, J., Cho, W., Hannun, Y. A. and Obeid, L. M. (2005). "Tumor necrosis factor induces the loss of sphingosine kinase-1 by a cathepsin B-dependent mechanism." J Biol Chem **280** (17) : 17196-17202.

Takagishi, T., Takehara, M., Seike, S., Miyamoto, K., Kobayashi, K. and Nagahama, M. (2017). "Clostridium perfringens alpha-toxin impairs erythropoiesis by inhibition of erythroid differentiation." Sci Rep **7** (1) : 5217.

Takashima, S., Sugimoto, N., Takuwa, N., Okamoto, Y., Yoshioka, K., Takamura, M., Takata, S., Kaneko, S. and Takuwa, Y. (2008). "G12/13 and Gq mediate S1P2-induced inhibition of Rac and migration in vascular smooth muscle in a manner dependent on Rho but not Rho kinase." Cardiovasc Res **79** (4) : 689-697.

Takemoto, C. M., Brandal, S., Jegga, A. G., Lee, Y. N., Shahlaee, A., Ying, Y., Dekoter, R. and McDevitt, M. A. (2010). "PU.1 positively regulates GATA-1 expression in mast cells." J Immunol **184** (8) : 4349-4361.

Taketani, S., Inazawa, J., Abe, T., Furukawa, T., Kohno, H., Tokunaga, R., Nishimura, K. and Inokuchi, H. (1995). "The human protoporphyrinogen oxidase gene (PPOX): organization and location to chromosome 1." Genomics **29** (3) : 698-703.

Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E. L., Hartmann, D., Lullmann-Rauch, R., Janssen, P. M., Blanz, J., von Figura, K. and Saftig, P. (2000). "Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice." Nature **406** (6798) : 902-906.

Tani, M. and Hannun, Y. A. (2007a). "Analysis of membrane topology of neutral sphingomyelinase 2." FEBS Lett **581** (7) : 1323-1328.

Tani, M. and Hannun, Y. A. (2007b). "Neutral sphingomyelinase 2 is palmitoylated on multiple cysteine residues. Role of palmitoylation in subcellular localization." J Biol Chem **282** (13) : 10047-10056.

Tani, M., Igarashi, Y. and Ito, M. (2005). "Involvement of neutral ceramidase in ceramide metabolism at the plasma membrane and in extracellular milieu." J Biol Chem **280** (44) : 36592-36600.

Tani, M., Iida, H. and Ito, M. (2003). "O-glycosylation of mucin-like domain retains the neutral ceramidase on the plasma membranes as a type II integral membrane protein." J Biol Chem **278** (12) : 10523-10530.

Taniguchi, M., Kitatani, K., Kondo, T., Hashimoto-Nishimura, M., Asano, S., Hayashi, A., Mitsutake, S., Igarashi, Y., Umehara, H., Takeya, H., *et al.* (2012). "Regulation of autophagy and its associated cell death by "sphingolipid rheostat": reciprocal role of ceramide and sphingosine 1-phosphate in the mammalian target of rapamycin pathway." J Biol Chem **287** (47) : 39898-39910.

Tavakolpour, S., Alavian, S. M. and Sali, S. (2016). "Hepatitis B Reactivation During Immunosuppressive Therapy or Cancer Chemotherapy, Management, and Prevention: A Comprehensive Review-Screened." Hepat Mon **16** (4) : e35810.

Testa, U., Grignani, F., Hassan, H. J., Rogaia, D., Masciulli, R., Gelmetti, V., Guerriero, R., Macioce, G., Liberatore, C., Barberi, T., *et al.* (1998). "Terminal megakaryocytic differentiation of TF-1 cells is induced by phorbol esters and thrombopoietin and is blocked by expression of PML/RARalpha fusion protein." Leukemia **12** (4) : 563-570.

Thompson, R. C., Herscovitch, M., Zhao, I., Ford, T. J. and Gilmore, T. D. (2011). "NF-kappaB down-regulates expression of the B-lymphoma marker CD10 through a miR-155/PU.1 pathway." J Biol Chem **286** (3) : 1675-1682.

Tilg, H., Ulmer, H., Kaser, A. and Weiss, G. (2002). "Role of IL-10 for induction of anemia during inflammation." J Immunol **169** (4) : 2204-2209.

Tili, E., Michaille, J. J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C. D., Adair, B., Fabbri, M., Alder, H., Liu, C. G., Calin, G. A., *et al.* (2007). "Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock." J Immunol **179** (8) : 5082-5089.

Tirodkar, T. S., Lu, P., Bai, A., Scheffel, M. J., Gencer, S., Garrett-Mayer, E., Bielawska, A., Ogretmen, B. and Voelkel-Johnson, C. (2015). "Expression of Ceramide Synthase 6 Transcriptionally Activates Acid Ceramidase in a c-Jun N-terminal Kinase (JNK)-dependent Manner." J Biol Chem **290** (21) : 13157-13167.

Tolhuis, B., Palstra, R. J., Splinter, E., Grosveld, F. and de Laat, W. (2002). "Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus." Mol Cell **10** (6) : 1453-1465.

Trainor, C. D., Omichinski, J. G., Vandergon, T. L., Gronenborn, A. M., Clore, G. M. and Felsenfeld, G. (1996). "A palindromic regulatory site within vertebrate GATA-1 promoters requires both zinc fingers of the GATA-1 DNA-binding domain for high-affinity interaction." Mol Cell Biol **16** (5) : 2238-2247.

Trecul, A., Morceau, F., Gaigneaux, A., Schnekenburger, M., Dicato, M. and Diederich, M. (2014). "Valproic acid regulates erythro-megakaryocytic differentiation through the modulation of transcription factors and microRNA regulatory micro-networks." Biochem Pharmacol **92** (2) : 299-311.

Trentesaux, C., Nyong, M. N., Aries, A., Morceau, F., Ronchi, A., Ottolenghi, S., Jardillier, J. C. and Jeannesson, P. (1993). "Increased expression of GATA-1 and NFE-2 erythroid-specific transcription factors during aclacinomycin-mediated differentiation of human erythroleukemic cells." Leukemia **7** (3) : 452-457.

Trocoli, A., Bensadoun, P., Richard, E., Labrunie, G., Merhi, F., Schlafli, A. M., Brigger, D., Souquere, S., Pierron, G., Pasquet, J. M., *et al.* (2014). "p62/SQSTM1 upregulation constitutes a survival mechanism that occurs during granulocytic differentiation of acute myeloid leukemia cells." Cell Death Differ **21** (12) : 1852-1861.

Tsai, S. F., Strauss, E. and Orkin, S. H. (1991). "Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter." Genes Dev **5** (6) : 919-931.

Tsang, A. P., Fujiwara, Y., Hom, D. B. and Orkin, S. H. (1998). "Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG." Genes Dev **12** (8) : 1176-1188.

Tsang, A. P., Visvader, J. E., Turner, C. A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M. J., Crossley, M. and Orkin, S. H. (1997). "FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation." Cell **90** (1) : 109-119.

Tschiya, T., Okada, M., Ueda, M. and Yasukochi, Y. (1997). "Activation of the erythropoietin promoter by a point mutation from GATA to TATA in the -30 region." J Biochem **121** (2) : 193-196.

Tugores, A., Magness, S. T. and Brenner, D. A. (1994). "A single promoter directs both housekeeping and erythroid preferential expression of the human ferrochelatase gene." J Biol Chem **269** (49) : 30789-30797.

Ueda, Y., Kondo, M. and Kelsoe, G. (2005). "Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow." J Exp Med **201** (11) : 1771-1780.

Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M. and Parton, R. G. (1996). "Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome." J Cell Biol **135** (4) : 913-924.

Ulrych, T., Bohm, A., Polzin, A., Daum, G., Nusing, R. M., Geisslinger, G., Hohlfeld, T., Schror, K. and Rauch, B. H. (2011). "Release of sphingosine-1-phosphate from human platelets is dependent on thromboxane formation." J Thromb Haemost **9** (4) : 790-798.

Urwin, H., Authier, A., Nielsen, J. E., Metcalf, D., Powell, C., Froud, K., Malcolm, D. S., Holm, I., Johannsen, P., Brown, J., *et al.* (2010). "Disruption of endocytic trafficking in frontotemporal dementia with CHMP2B mutations." Hum Mol Genet **19** (11) : 2228-2238.

- Ushio, H., Ueno, T., Kojima, Y., Komatsu, M., Tanaka, S., Yamamoto, A., Ichimura, Y., Ezaki, J., Nishida, K., Komazawa-Sakon, S., *et al.* (2011). "Crucial role for autophagy in degranulation of mast cells." J Allergy Clin Immunol **127** (5) : 1267-1276 e1266.
- Vadlamudi, R. K. and Shin, J. (1998). "Genomic structure and promoter analysis of the p62 gene encoding a non-proteasomal multiubiquitin chain binding protein." FEBS Lett **435** (2-3) : 138-142.
- Vakoc, C. R., Letting, D. L., Gheldof, N., Sawado, T., Bender, M. A., Groudine, M., Weiss, M. J., Dekker, J. and Blobel, G. A. (2005). "Proximity among distant regulatory elements at the beta-globin locus requires GATA-1 and FOG-1." Mol Cell **17** (3) : 453-462.
- Van Brocklyn, J., Letterle, C., Snyder, P. and Prior, T. (2002). "Sphingosine-1-phosphate stimulates human glioma cell proliferation through Gi-coupled receptors: role of ERK MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase beta." Cancer Lett **181** (2) : 195-204.
- van de Laar, L., Coffey, P. J. and Woltman, A. M. (2012). "Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy." Blood **119** (15) : 3383-3393.
- van der Bruggen, T., Nijenhuis, S., van Raaij, E., Verhoef, J. and van Asbeck, B. S. (1999). "Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway." Infect Immun **67** (8) : 3824-3829.
- Vannini, N., Girotra, M., Naveiras, O., Nikitin, G., Campos, V., Giger, S., Roch, A., Auwerx, J. and Lutolf, M. P. (2016). "Specification of haematopoietic stem cell fate via modulation of mitochondrial activity." Nat Commun **7** 13125.
- Vannucchi, A. M., Grossi, A., Rafanelli, D., Statello, M., Cinotti, S. and Rossi-Ferrini, P. (1994). "Inhibition of erythropoietin production in vitro by human interferon gamma." Br J Haematol **87** (1) : 18-23.
- Varol, C., Mildner, A. and Jung, S. (2015). "Macrophages: development and tissue specialization." Annu Rev Immunol **33** 643-675.
- Verhoef, C., de Wilt, J. H., Grunhagen, D. J., van Geel, A. N., ten Hagen, T. L. and Eggermont, A. M. (2007). "Isolated limb perfusion with melphalan and TNF-alpha in the treatment of extremity sarcoma." Curr Treat Options Oncol **8** (6) : 417-427.
- Vian, L., Di Carlo, M., Pelosi, E., Fazi, F., Santoro, S., Cerio, A. M., Boe, A., Rotilio, V., Billi, M., Racanicchi, S., *et al.* (2014). "Transcriptional fine-tuning of microRNA-223 levels directs lineage choice of human hematopoietic progenitors." Cell Death Differ **21** (2) : 290-301.

Vido, J. R., Adam, R. L., Lorand-Metze, I. G. and Metze, K. (2011). "Computerized texture analysis of atypical immature myeloid precursors in patients with myelodysplastic syndromes: an entity between blasts and promyelocytes." Diagn Pathol **6** 93.

Vigorito, E., Perks, K. L., Abreu-Goodger, C., Bunting, S., Xiang, Z., Kohlhaas, S., Das, P. P., Miska, E. A., Rodriguez, A., Bradley, A., *et al.* (2007). "microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells." Immunity **27** (6) : 847-859.

Visvader, J. E., Elefanty, A. G., Strasser, A. and Adams, J. M. (1992). "GATA-1 but not SCL induces megakaryocytic differentiation in an early myeloid line." EMBO J **11** (12) : 4557-4564.

von Flidner, V., Miescher, S., Gerain, J., Gallati, H., Barras, C., Heumann, D. and Cerottini, J. C. (1992). "Production of tumor necrosis factor-alpha by naive or memory T lymphocytes activated via CD28." Cell Immunol **139** (1) : 198-207.

Wadman, I. A., Osada, H., Grutz, G. G., Agulnick, A. D., Westphal, H., Forster, A. and Rabbitts, T. H. (1997). "The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins." EMBO J **16** (11) : 3145-3157.

Wagers, A. J., Christensen, J. L. and Weissman, I. L. (2002). "Cell fate determination from stem cells." Gene Ther **9** (10) : 606-612.

Walev, I., Weller, U., Strauch, S., Foster, T. and Bhakdi, S. (1996). "Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of Staphylococcus aureus." Infect Immun **64** (8) : 2974-2979.

Wang, D., Paz-Priel, I. and Friedman, A. D. (2009). "NF-kappa B p50 regulates C/EBP alpha expression and inflammatory cytokine-induced neutrophil production." J Immunol **182** (9) : 5757-5762.

Wang, J., Fang, Y., Yan, L., Yuan, N., Zhang, S., Xu, L., Nie, M., Zhang, X. and Wang, J. (2016a). "Erythroleukemia cells acquire an alternative mitophagy capability." Sci Rep **6** 24641.

Wang, J., Tran, J., Wang, H., Guo, C., Harro, D., Campbell, A. D. and Eitzman, D. T. (2016b). "mTOR Inhibition improves anaemia and reduces organ damage in a murine model of sickle cell disease." Br J Haematol **174** (3) : 461-469.

Wang, J. M., Lai, M. Z. and Yang-Yen, H. F. (2003). "Interleukin-3 stimulation of mcl-1 gene transcription involves activation of the PU.1 transcription factor through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway." Mol Cell Biol **23** (6) : 1896-1909.

Wang, L. S., Li, L., Li, L., Chu, S., Shiang, K. D., Li, M., Sun, H. Y., Xu, J., Xiao, F. J., Sun, G., *et al.* (2015a). "MicroRNA-486 regulates normal erythropoiesis and



enhances growth and modulates drug response in CML progenitors." Blood **125** (8) : 1302-1313.

Wang, M. X., Cheng, X. Y., Jin, M., Cao, Y. L., Yang, Y. P., Wang, J. D., Li, Q., Wang, F., Hu, L. F. and Liu, C. F. (2015b). "TNF compromises lysosome acidification and reduces alpha-synuclein degradation via autophagy in dopaminergic cells." Exp Neurol **271** 112-121.

Ward, A. C., Loeb, D. M., Soede-Bobok, A. A., Touw, I. P. and Friedman, A. D. (2000). "Regulation of granulopoiesis by transcription factors and cytokine signals." Leukemia **14** (6) : 973-990.

Warnecke, C., Zaborowska, Z., Kurreck, J., Erdmann, V. A., Frei, U., Wiesener, M. and Eckardt, K. U. (2004). "Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells." FASEB J **18** (12) : 1462-1464.

Warr, M. R., Binnewies, M., Flach, J., Reynaud, D., Garg, T., Malhotra, R., Debnath, J. and Passegue, E. (2013). "FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells." Nature **494** (7437) : 323-327.

Wei, Y., Miller, S. C., Tsuji, Y., Torti, S. V. and Torti, F. M. (1990). "Interleukin 1 induces ferritin heavy chain in human muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **169** (1) : 289-296.

Weichhart, T., Hengstschlager, M. and Linke, M. (2015). "Regulation of innate immune cell function by mTOR." Nat Rev Immunol **15** (10) : 599-614.

Wesemann, D. R. and Benveniste, E. N. (2003). "STAT-1 alpha and IFN-gamma as modulators of TNF-alpha signaling in macrophages: regulation and functional implications of the TNF receptor 1:STAT-1 alpha complex." J Immunol **171** (10) : 5313-5319.

Whyatt, D., Lindeboom, F., Karis, A., Ferreira, R., Milot, E., Hendriks, R., de Bruijn, M., Langeveld, A., Gribnau, J., Grosveld, F., *et al.* (2000). "An intrinsic but cell-nonautonomous defect in GATA-1-overexpressing mouse erythroid cells." Nature **406** (6795) : 519-524.

Wickramasinghe, S. N. and Bush, V. (1977). "An investigation into the development and fate of neutrophil giant metamyelocytes using the techniques of electron microscopy and high resolution autoradiography." Br J Haematol **35** (4) : 659-664.

Wiegmann, K., Schutze, S., Machleidt, T., Witte, D. and Kronke, M. (1994). "Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling." Cell **78** (6) : 1005-1015.

Winkler, I. G., Sims, N. A., Pettit, A. R., Barbier, V., Nowlan, B., Helwani, F., Poulton, I. J., van Rooijen, N., Alexander, K. A., Raggatt, L. J., *et al.* (2010). "Bone

marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs." Blood **116** (23) : 4815-4828.

Wontakal, S. N., Guo, X., Smith, C., MacCarthy, T., Bresnick, E. H., Bergman, A., Snyder, M. P., Weissman, S. M., Zheng, D. and Skoultchi, A. I. (2012). "A core erythroid transcriptional network is repressed by a master regulator of myeloid differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **109** (10) : 3832-3837.

Wu, B. X., Rajagopalan, V., Roddy, P. L., Clarke, C. J. and Hannun, Y. A. (2010). "Identification and characterization of murine mitochondria-associated neutral sphingomyelinase (MA-nSMase), the mammalian sphingomyelin phosphodiesterase 5." J Biol Chem **285** (23) : 17993-18002.

Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R. and Lodish, H. F. (1995). "Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor." Cell **83** (1) : 59-67.

Xiao, W., Koizumi, K., Nishio, M., Endo, T., Osawa, M., Fujimoto, K., Sato, I., Sakai, T., Koike, T. and Sawada, K. (2002). "Tumor necrosis factor-alpha inhibits generation of glycophorin A+ cells by CD34+ cells." Exp Hematol **30** (11) : 1238-1247.

Xie, N., Zhong, L., Liu, L., Fang, Y., Qi, X., Cao, J., Yang, B., He, Q. and Ying, M. (2014). "Autophagy contributes to dasatinib-induced myeloid differentiation of human acute myeloid leukemia cells." Biochem Pharmacol **89** (1) : 74-85.

Xin, Q., Li, J., Dang, J., Bian, X., Shan, S., Yuan, J., Qian, Y., Liu, Z., Liu, G., Yuan, Q., *et al.* (2015). "miR-155 Deficiency Ameliorates Autoimmune Inflammation of Systemic Lupus Erythematosus by Targeting S1pr1 in Fas<sup>lpr/lpr</sup> Mice." J Immunol **194** (11) : 5437-5445.

Xing, H. R. and Kolesnick, R. (2001). "Kinase suppressor of Ras signals through Thr269 of c-Raf-1." J Biol Chem **276** (13) : 9733-9741.

Xiong, Y., Yang, P., Proia, R. L. and Hla, T. (2014). "Erythrocyte-derived sphingosine 1-phosphate is essential for vascular development." J Clin Invest **124** (11) : 4823-4828.

Xu, F., Yang, C. C., Gomillion, C. and Burg, K. J. (2010a). "Effect of ceramide on mesenchymal stem cell differentiation toward adipocytes." Appl Biochem Biotechnol **160** (1) : 197-212.

Xu, R., Sun, W., Jin, J., Obeid, L. M. and Mao, C. (2010b). "Role of alkaline ceramidases in the generation of sphingosine and its phosphate in erythrocytes." FASEB J **24** (7) : 2507-2515.

Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R. and Tashiro, Y. (1998). "Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells." Cell Struct Funct **23** (1) : 33-42.

Yamanaka, M., Shegogue, D., Pei, H., Bu, S., Bielawska, A., Bielawski, J., Pettus, B., Hannun, Y. A., Obeid, L. and Trojanowska, M. (2004). "Sphingosine kinase 1 (SPHK1) is induced by transforming growth factor-beta and mediates TIMP-1 up-regulation." J Biol Chem **279** (52) : 53994-54001.

Yamazaki, S., Ema, H., Karlsson, G., Yamaguchi, T., Miyoshi, H., Shioda, S., Taketo, M. M., Karlsson, S., Iwama, A. and Nakauchi, H. (2011). "Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche." Cell **147** (5) : 1146-1158.

Yan, Z. W., Hou, J. K., He, W., Fan, L. and Huang, Y. (2013). "Chloroquine enhances cobalt chloride-induced leukemic cell differentiation via the suppression of autophagy at the late phase." Biochem Biophys Res Commun **430** (3) : 926-932.

Yen, W. L., Shintani, T., Nair, U., Cao, Y., Richardson, B. C., Li, Z., Hughson, F. M., Baba, M. and Klionsky, D. J. (2010). "The conserved oligomeric Golgi complex is involved in double-membrane vesicle formation during autophagy." J Cell Biol **188** (1) : 101-114.

Yomogida, K., Ohtani, H., Harigae, H., Ito, E., Nishimune, Y., Engel, J. D. and Yamamoto, M. (1994). "Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells." Development **120** (7) : 1759-1766.

Yorimitsu, T., He, C., Wang, K. and Klionsky, D. J. (2009). "Tap42-associated protein phosphatase type 2A negatively regulates induction of autophagy." Autophagy **5** (5) : 616-624.

Young, A. R., Chan, E. Y., Hu, X. W., Kochl, R., Crawshaw, S. G., High, S., Hailey, D. W., Lippincott-Schwartz, J. and Tooze, S. A. (2006). "Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes." J Cell Sci **119** (Pt 18) : 3888-3900.

Young, M. M., Kester, M. and Wang, H. G. (2013). "Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy." J Lipid Res **54** (1) : 5-19.

Young, M. M., Takahashi, Y., Fox, T. E., Yun, J. K., Kester, M. and Wang, H. G. (2016). "Sphingosine Kinase 1 Cooperates with Autophagy to Maintain Endocytic Membrane Trafficking." Cell Rep **17** (6) : 1532-1545.

Yu, D., dos Santos, C. O., Zhao, G., Jiang, J., Amigo, J. D., Khandros, E., Dore, L. C., Yao, Y., D'Souza, J., Zhang, Z., *et al.* (2010). "miR-451 protects against erythroid oxidant stress by repressing 14-3-3zeta." Genes Dev **24** (15) : 1620-1633.

Yu, X., Kong, Y., Dore, L. C., Abdulmalik, O., Katein, A. M., Zhou, S., Choi, J. K., Gell, D., Mackay, J. P., Gow, A. J., *et al.* (2007). "An erythroid chaperone that facilitates folding of alpha-globin subunits for hemoglobin synthesis." J Clin Invest **117** (7) : 1856-1865.

Zamai, L., Secchiero, P., Pierpaoli, S., Bassini, A., Papa, S., Alnemri, E. S., Guidotti, L., Vitale, M. and Zauli, G. (2000). "TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis." Blood **95** (12) : 3716-3724.

Zavodszky, E., Vicinanza, M. and Rubinsztein, D. C. (2013). "Biology and trafficking of ATG9 and ATG16L1, two proteins that regulate autophagosome formation." FEBS Lett **587** (13) : 1988-1996.

Zeng, Y. and Cullen, B. R. (2004). "Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5." Nucleic Acids Res **32** (16) : 4776-4785.

Zhang, C., Yan, J., Xiao, Y., Shen, Y., Wang, J., Ge, W. and Chen, Y. (2017). "Inhibition of Autophagic Degradation Process Contributes to Claudin-2 Expression Increase and Epithelial Tight Junction Dysfunction in TNF-alpha Treated Cell Monolayers." Int J Mol Sci **18** (1) : .

Zhang, J. and Ney, P. A. (2008). "NIX induces mitochondrial autophagy in reticulocytes." Autophagy **4** (3) : 354-356.

Zhang, J., Randall, M. S., Loyd, M. R., Dorsey, F. C., Kundu, M., Cleveland, J. L. and Ney, P. A. (2009). "Mitochondrial clearance is regulated by Atg7-dependent and -independent mechanisms during reticulocyte maturation." Blood **114** (1) : 157-164.

Zhang, J., Wu, K., Xiao, X., Liao, J., Hu, Q., Chen, H., Liu, J. and An, X. (2015a). "Autophagy as a regulatory component of erythropoiesis." Int J Mol Sci **16** (2) : 4083-4094.

Zhang, P., Zhang, X., Iwama, A., Yu, C., Smith, K. A., Mueller, B. U., Narravula, S., Torbett, B. E., Orkin, S. H. and Tenen, D. G. (2000). "PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding." Blood **96** (8) : 2641-2648.

Zhang, X., Camprecios, G., Rimmele, P., Liang, R., Yalcin, S., Mungamuri, S. K., Barminko, J., D'Escamard, V., Baron, M. H., Brugnara, C., *et al.* (2014). "FOXO3-mTOR metabolic cooperation in the regulation of erythroid cell maturation and homeostasis." Am J Hematol **89** (10) : 954-963.

Zhang, Y., Morgan, M. J., Chen, K., Choksi, S. and Liu, Z. G. (2012). "Induction of autophagy is essential for monocyte-macrophage differentiation." Blood **119** (12) : 2895-2905.

Zhang, Y., Yao, B., Delikat, S., Bayoumy, S., Lin, X. H., Basu, S., McGinley, M., Chan-Hui, P. Y., Lichenstein, H. and Kolesnick, R. (1997). "Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase." Cell **89** (1) : 63-72.

Zhang, Y., Zhang, J. and Studzinski, G. P. (2006). "AKT pathway is activated by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and participates in its anti-apoptotic effect and cell cycle control in differentiating HL60 cells." Cell Cycle **5** (4) : 447-451.

Zhang, Y. C., Ye, H., Zeng, Z., Chin, Y. E., Huang, Y. N. and Fu, G. H. (2015b). "The NF-kappaB p65/miR-23a-27a-24 cluster is a target for leukemia treatment." Oncotarget **6** (32) : 33554-33567.

Zhao, D., Zhuang, N., Ding, Y., Kang, Y. and Shi, L. (2016). "MiR-221 activates the NF-kappaB pathway by targeting A20." Biochem Biophys Res Commun **472** (1) : 11-18.

Zhao, H., Kalota, A., Jin, S. and Gewirtz, A. M. (2009). "The c-myc proto-oncogene and microRNA-15a comprise an active autoregulatory feedback loop in human hematopoietic cells." Blood **113** (3) : 505-516.

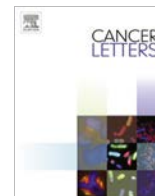
Zhao, W., Kitidis, C., Fleming, M. D., Lodish, H. F. and Ghaffari, S. (2006). "Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway." Blood **107** (3) : 907-915.

Zhong, Y., Wang, Q. J., Li, X., Yan, Y., Backer, J. M., Chait, B. T., Heintz, N. and Yue, Z. (2009). "Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex." Nat Cell Biol **11** (4) : 468-476.

Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P. J., Liu, Y. J., MacPherson, G., Randolph, G. J., *et al.* (2010). "Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood." Blood **116** (16) : e74-80.

Zon, L. I., Youssoufian, H., Mather, C., Lodish, H. F. and Orkin, S. H. (1991). "Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1." Proc Natl Acad Sci U S A **88** (23) : 10638-10641.

# ANNEXES



## Polyphenol tri-vanillic ester 13c inhibits P-JAK2V617F and Bcr–Abl oncokinase expression in correlation with STAT3/STAT5 inactivation and apoptosis induction in human leukemia cells



Anne Trécul<sup>a</sup>, Franck Morceau<sup>a</sup>, Anthonla Gaigneaux<sup>a</sup>, Marion Orsini<sup>a</sup>, Sébastien Chateauvieux<sup>a</sup>, Cindy Grandjenette<sup>a</sup>, Mario Dicato<sup>a</sup>, Marc Diederich<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, 9, Rue Edward Steichen, 2540 Luxembourg, Luxembourg

<sup>b</sup>Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 April 2013

Received in revised form 17 June 2013

Accepted 20 June 2013

#### Keywords:

Kinase  
JAK2  
Bcr–Abl  
13c  
Polyphenol  
STAT

### ABSTRACT

Constitutive activity of kinases has been reported in many types of cancers, so that inhibition of “onco-kinases” became a validated anti-cancer strategy. We found that the polyphenol 13c, a tri-vanillate derivative, inhibited kinase phosphorylation in leukemia cells. P-JAK2, P-Src and P-PI3Kp85 inhibition occurred independently of phosphatase involvement in JAK2V617F expressing HEL cells while 13c inhibited Bcr–Abl expression without inhibition of phosphorylation in chronic myelogenous leukemia cell lines (K562, MEG-01). In correlation with kinase inhibition, 13c abolished constitutive P-STAT3/P-STAT5 expression, down-regulated Mcl-1 and c-Myc gene expression and induced apoptosis. Altogether, polyphenol 13c displays potential antitumor activities by affecting onco-kinases and STAT activities.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Polyphenols are widely present in the vegetal kingdom as the products of the secondary metabolism of plants. Many studies have shown their potentialities as chemopreventive and anticancer agents as well as for the treatment of cardiovascular, inflammatory and neurodegenerative diseases [1]. Based on anticancer activities of vanillin, Lamoral-Theys et al. reported the cytostatic effect of a series of vanillate derivatives on several cancer cell lines in comparison to curcumin, a well known divanillate-based polyphenol for its anti-inflammatory and chemopreventive properties [2]. Among 33 di- and trivanillate based polyphenol compounds studied, the authors reported that the tri-chloro derivative of trivanillic ester 13c, displayed one of the most potent *in vitro* antitumor activity. Besides cytostatic properties, 13c showed potent inhibitory activity of protein kinases in an *in vitro* kinase assay [3].

Many cancers express constitutively active kinases including Src (sarcoma viral oncogene homolog), JAK (Janus Kinase), Bcr–Abl (breakpoint cluster region-Abelson) and EGFR (epidermal growth factor receptor) [4,5]. Indeed, permanent activation of

onco-kinases leads to upregulation of genes involved in cell cycle and survival including cyclins, c-Myc, Bcl-xL and Mcl-1 among others [5,6] through the constitutive activation of transcription factors including Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT). Inhibition of constitutive activities and permanent phosphorylation status of tyrosine kinases is a promising therapeutic pathway as revealed by Imatinib/Gleevec for example. Moreover, inactivation of STAT3 in cancer cells is recognized as a promising strategy to be associated to anticancer therapies. Many synthetic and natural P-STAT3 inhibitors have been described *in vitro*, while no clinical studies have been published to date [7].

In physiological conditions, JAK2 activation results from erythropoietin (EPO)-, interleukine (IL)6-, IL10- or interferon (IFN)-gamma receptor stimulation. The mutated form of JAK2, namely JAK2V617F is observed in 95% of patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms, polycythemia vera and essential thrombocythemia and myelofibrosis [8–11]. This mutation makes the kinase hypersensitive or independent of hematopoietic cytokines. The substitution V617F is located within the Jak homology 2 (JH2) domain of the protein, which is a pseudo-kinase. JH2 domain regulates associated receptor phosphorylation through auto-inhibitory properties, which are abolished in the mutated protein. Consequently, mutated JAK2 continuously activates signaling pathways including PI3K/AKT, ERK/MAPK pathways and

\* Corresponding author. Tel.: +82 2 880 8919.

E-mail address: [marcdiederich@snu.ac.kr](mailto:marcdiederich@snu.ac.kr) (M. Diederich).

STAT transcription factors, in the absence of membrane receptor stimulation by the ligand [9]. Specifically, constitutive activation of STAT3 has been linked to tumor development and is now widely recognized as a cancer-promoting factor. Besides, several reports have shown that the PI3K/AKT pathway as well as the independent receptor kinase Src leads to STAT3 activation [12,13]. Moreover, STAT3 is frequently activated in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloid leukemia (AML) [14].

In this study we investigated the effect of 13c on constitutive phosphorylation of the protein kinase JAK2 in the human erythroleukemia (HEL) cell line expressing homozygous JAK2V617F protein. Furthermore we evaluated the effect of 13c on the oncogenic fusion protein kinase Bcr–Abl, which characterizes 90% of chronic myeloid leukemia cells (CML) [15]. Bcr–Ablp210 protein is the most frequent variant [16]. In contrast to constitutive kinase activity resulting from conformational modification in JAK2V617F, Bcr–Abl kinase activity results from a reciprocal chromosomal translocation t(9;22)(q34;q11) giving rise to the Philadelphia chromosome. Abl protein is a tyrosine kinase which autoregulates through Src-homology (SH)2–SH3 domains and myristoylation in the N-terminal region [17]. In Bcr–Abl protein the regulation site of the kinase is lost and tyrosine kinase activity becomes permanent [18] leading to constitutive activation of cell signaling pathways. In Bcr–Abl positive cells, constitutive activation of STAT factors, particularly phosphorylated (P)STAT5, which is the cause of initiation and maintenance of CML [19–21], would result from Bcr–Abl activity independently of JAK. Bcr–Abl-mediated activation by STAT could occur through SH2 domain as for Src [22]. Besides, STAT factors and target genes can be activated by Bcr–Abl through activation of PI3K/AKT and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways.

According to *in vitro* kinase assays, this work confirms the ability of the polyphenol 13c to inhibit kinase activities *in cellulo*. Constitutive expression of P-JAK2, P-Src and P-PI3K was inhibited at different tyrosine residues in HEL cells, in correlation with decreased STAT3 activation. Moreover, 13c inhibited Bcr–Abl expression in CML MEG-01 and K562 cells, while phosphorylation status in regulatory sites was not affected. However, P-ERK and P-STAT5 expressions were also inhibited. The expression of c-myc and Mcl-1 was downregulated in the different models in correlation with a decrease in cell proliferation and apoptosis induction.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cells, culture and treatments

All the cell lines, HEL (acute myeloid leukemia), A549 (lung adenocarcinoma), K562 and MEG-01 (chronic myelogenous leukemia) were obtained from Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany) and cultured in RPMI 1640 (Cambrex-Longa) containing 10% fetal calf serum (SCF) and 1% of a mixture of antibiotics (penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 µg/mL of Cambrex) and antifungal agents (amphotericin B 25 µg/mL). TF1 cell line was grown in the presence of 5 ng/mL GM-CSF (PeproTechnology) or 10 U/mL recombinant erythropoietin (Eprex, Janssen-Cilag) in the culture medium. All cells were cultured in an incubator at 37 °C, 95% humidity and 5% CO<sub>2</sub>. For suspension cells, medium was renewed every three days and the cells were resuspended at a concentration of 2 × 10<sup>6</sup> cells/mL. For A549 adherent cells, medium was renewed every two days and the cells were resuspended at a concentration of 1–2 × 10<sup>6</sup> cells per 80 cm<sup>2</sup>. Cell viability was estimated by Trypan blue (Cambrex) staining.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were purified using Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Roosendaal, The Netherlands). PBMCs were isolated by density gradient centrifugation from freshly collected buffy coats obtained from healthy adult human volunteers (Red Cross, Luxembourg, Luxembourg). All healthy volunteers gave informed written consent. After isolation, cells were washed twice in 1X PBS and adjusted at 2 × 10<sup>6</sup> cells/mL in RPMI 1640 (supplemented with 1% antibiotic–antimycotic (Lonza) and 10% FCS (Lonza)).

The tri-vanillate 13c was synthesized and purified as previously described [23]. Stattic (Santa Cruz) was used as a specific inhibitor of P-STAT3. Interferon (IFN)-γ (Sigma) 100 ng/mL and interleukin (IL)-6 (Sigma) 50 ng/mL were used as P-STAT3 inducers.

### 2.2. Hoechst reagent and propidium iodide

Hoechst 33342 (Calbiochem VWR International) at 1 µg/mL was added (3 µL) to 10<sup>6</sup> cells in RPMI. The mixture was incubated at 37 °C for 20 min. Then the cells were centrifuged at 350g for 5 min. Then 20 µL of propidium iodide (PI) (diluted to 1/500) were added to the cell pellet. The apoptotic or necrotic state of the cells was analyzed by fluorescence microscopy (Olympus inverted microscope Cell M).

### 2.3. Protein extractions

Total protein extracts were prepared from approximately 10<sup>7</sup> cells. Cells were lysed by vigorous stirring at 4 °C for 15 min in 250 µL of a mixture containing MPER lysis buffer (Mammalian Protein Extraction Reagent, Pierce, Belgium), a cocktail of protease inhibitors (Complete (Roche) and 1.65 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Sigma)) and phosphatase inhibitors (Phosphostop (Roche), 4.1 mM sodium fluoride (NaF) and 0.8 mM ortho-vanadate (OV) (Sigma)). The homogenate was centrifuged 15 min at 18,000g at 4 °C.

Nuclear and cytoplasmic proteins were extracted from 5 × 10<sup>6</sup> to 10<sup>7</sup> cells as previously described according to Schreiber et al. [24]. Protein concentrations were determined by the Bradford method using BioRad reagent (BioRad Laboratories).

### 2.4. Western Blot

Ten to twenty micrograms of denatured protein extracts were resolved in a 10% SDS-polyacrylamide gel. Separated proteins were then transferred onto a PVDF membrane (GE Healthcare). The membranes were blocked in phosphate-buffered alkaline/0.1% Tween 20 (PBS-T) 1X, supplemented with 5% milk or 5% BSA according to the antibody manufacturer then probed with primary antibodies (STAT3/P-STAT3, STAT5/P-STAT5, Src/P-Src, JAK2/P-JAK2, PI3K/P-PI3K, AKT/P-AKT, ERK/P-ERK, Mcl-1, c-Myc, PTEN, SHP1, P-c-Abl, Caspase 7, Caspase 8, Caspase 9, (Cell Signaling, Leiden, The Netherlands), Bcl2, Tubulin-α (Calbiochem, Leuven, Belgium), PP2A, c-Abl, Caspase 3, Lamin B, NF-κB p50 and p65 (Santa Cruz Biotechnology, Tebu-Bio, Boechout, Belgium) and β-actin antibodies (Sigma)) and probed again with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Amersham Biosciences). Every step (membrane saturation and probing) was followed by three washes in PBS-T. The immunoreactive proteins were visualized using the enhanced chemiluminescence system (ECL+; Amersham Biosciences) by autoradiography.

### 2.5. Cell cycle analysis

Cell cycle distribution was analyzed according to standard procedures based on DNA staining with propidium iodide (1 µg/mL, Sigma–Aldrich) and RNase A (100 µg/mL; Roche) in PBS before analysis by FACS (FACSCalibur (BD Biosciences)). Events were recorded statistically (10,000 events/sample) using the CellQuest software (BD Biosciences). Then, the data were analyzed by using FlowJo 8.8.5 software (TreeStar, Ashland, OR, USA).

### 2.6. Total RNA extraction

All reagents used are treated anti-RNase. Total RNAs was extracted from 10<sup>7</sup> cells. The cells were washed in PBS 1X, centrifuged at 350g for 7 min and then lysed with TRIzol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen). Total RNA is separated from DNA by addition of 1-Bromo-3-chloropropane and centrifugation. The RNA present in the aqueous phase are precipitated in the presence of isopropanol. RNA pellets were sedimented by centrifugation at 4 °C for 5 min at 10,000g and then dissolved in ultrapure water RNase free and quantified with a spectrophotometer (Nanodrop<sup>®</sup> ND-1000).

### 2.7. Reverse transcription and real time PCR

The SuperScript III<sup>™</sup> Reverse Transcriptase (Invitrogen, 200 U/µL) was used to perform reverse transcription of 3 µg of total RNA using Oligo(dT) primers (500 mg/mL). Real-time PCR analysis were performed using the Mesa Green qPCR MasterMix Plus for SYBR1 Assay (Eurogentec, Seraing, Belgium) according to the manufacturer's protocol with specific primers: c-Myc forward 5'-cac-gcagtcgtagtcgaggt-3', Mcl-1 forward 5'-ccaaggcatctctcgaaa-3', GAPDH forward 5'-acagtcagccgcatctctt-3'. Real-time PCR were performed using a 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystem, Lennik, Belgium). Quantification was performed in triplicate and expression levels were normalized using internal standards gene GAPDH. Relative gene expression levels correspond to fold induction compared with untreated cells.

### 2.8. Network building

Cytoscape 2.8.2 and 3.0.0 (Smoot, Ono et al. 2011) were used to find transcription factors interacting with kinases inhibited by 13c treatment. First we selected the 48 kinases whose residual activity was less than 50% after treatment. MIMI plugin [25] was used to find their common neighbors (neighbors of at least 2 kinases),



using all databases available. This resulted in a network of 408 nodes that was further filtered on the basis of GO annotations to restrict results to transcription factors.

Interactome of STAT5A, STAT5B, STAT3 and STAT1 was retrieved using Pathway Commons in Cytoscape 2.8.1 [26] and interactions from Cancer Cell Map, HPRD and Biogrid databases. Network was filtered by removing proteins whose residual activity was not measured.

### 2.9. Statistics

Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation and were analyzed by Student's *t*-test. This test compares the mean of each treatment with control medium. The difference between the series "control" and the series "treated", is considered significant for values of  $p < 0.01$  represented by \*\* and  $0.01 < p < 0.05$  represented by \*. The results represent the mean  $\pm$  standard deviation.

## 3. Results

### 3.1. Tri-vanillate derivative 13c has a robust impact on kinase activities *in vitro*

Lamoral-Teys et al. previously reported the *in vitro* effect of 2  $\mu$ M tri-vanillate derivative 13c (Fig. 1A) on activities of a panel of kinases (246 wild type proteins and 10 mutants) [3]. To find transcription factors (TF) that could be targeted by this treatment, we selected 48 kinases inhibited by more than 50% and built their interactome. After discarding non-TF from the network, we found that 27 TFs were linked to the kinases highly inhibited by 13c (Fig. 1B). Among them, STAT family of TFs was well represented (STAT1, 3, 5a and 5b) and together accounted for more than 25% of all interactions from kinases (30/113) (Kinase gene symbols and corresponding names are described in Table S1).

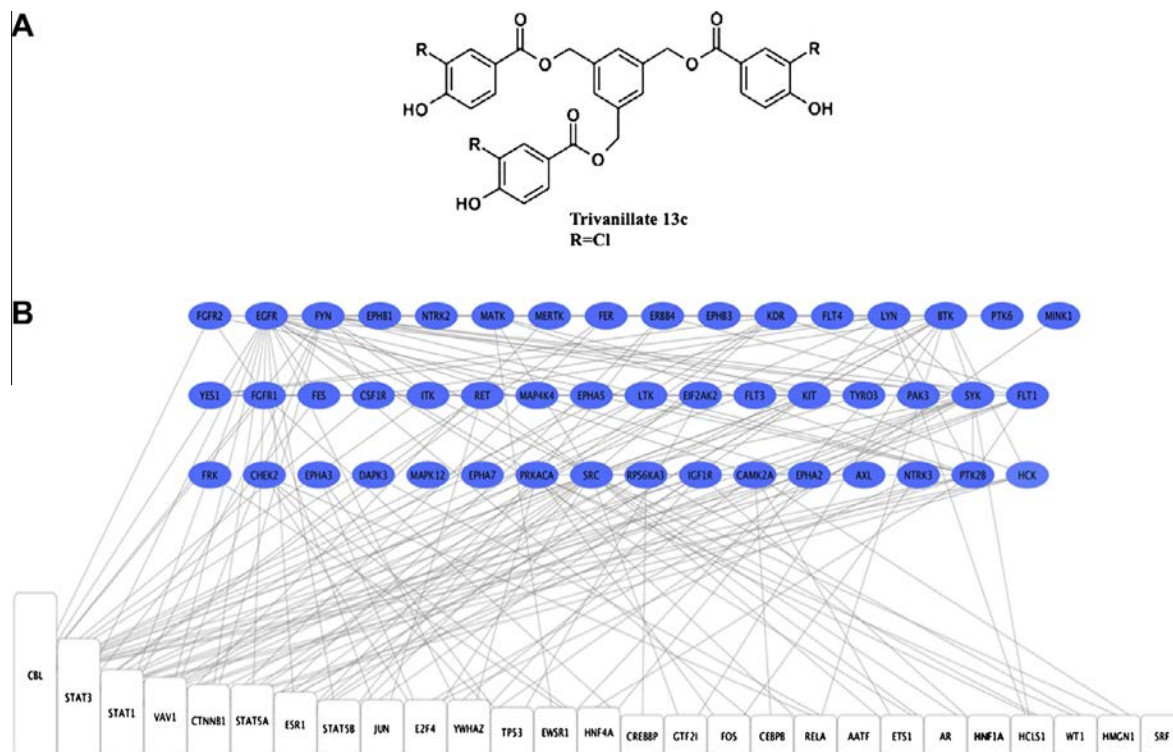
### 3.2. 13c inhibits JAK2/STAT3 pathway in HEL cells

In order to validate the capacity of 13c to inhibit kinase activation *in cellulo*, constitutive P-JAK2 expression was analyzed in acute myeloid leukemia HEL cells. Cells were treated with 1–100  $\mu$ M 13c for 72 h. Phosphorylation of tyrosine residues Y1007/1008 (P-JAK2) within the catalytic site has been assessed by western blot analysis. Results clearly showed that JAK2 is constitutively phosphorylated at this site in HEL cells. A full inhibition of P-JAK2 occurred with 50  $\mu$ M 13c whereas total JAK2 expression was not inhibited (Fig. 2A). However, we noticed a significant decrease in total JAK2 expression in cells treated with 100  $\mu$ M 13c for 72 h. The decrease in P-JAK2 by 50  $\mu$ M 13c occurred as soon as 6 h of treatment like for P-STAT3. Moreover, besides the inhibitory effect of 50  $\mu$ M 13c on JAK2 phosphorylation at the Y1007/1008 residues, our results showed also inhibition of Y221 phosphorylation (Fig. 2A).

On the other hand, analysis of the expression of non-receptor tyrosine kinase Src showed this onco-kinase to be constitutively activated in HEL cells. Interestingly, Src phosphorylation status at the residue Y416 was inhibited by 13c at 50  $\mu$ M in HEL cells (Fig. 2B). Moreover, PI3K/AKT pathway has been described as constitutively active in AML cells. Results of western blot analysis showed that 13c at 50  $\mu$ M inhibited phosphorylation of the regulatory subunit p85 of PI3K as well as its main substrate AKT in HEL cells (Fig. 2B).

### 3.3. 13c inhibits constitutive and induced P-STAT3 expression

P-JAK2, P-Src and P-PI3K have been reported to phosphorylate and activate the transcription factor STAT3. Analysis of phospho-STAT3 (P-STAT3) in HEL cells showed a constitutive activation of this transcription factor. In order to evaluate the ability of 13c to



**Fig. 1.** Chemical structure of 13c and transcription factors linked to kinases inhibited by 13c treatment. (A) 13c is a tri-chloro derivative of trivanillic ester. R = Cl. (B) Network showing transcription factors linked to (at least 2) kinases highly inhibited by 13c treatment (<50% residual activity). Kinases are represented in blue. Transcription factor (white) height is proportional to the number of kinases linked. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

inhibit this phosphorylation in agreement with upstream P-kinase inhibition, we analyzed STAT3 phosphorylation at the Y705 residue by western blot. The inhibitor of P-STAT3 Stattic (Stic) was used at 5  $\mu$ M as a positive control (Fig. 2C). In cells treated by 13c for 72 h, the expression of total STAT3 was not affected whatever the concentration used while the phosphorylation of Y705 was inhibited by 50  $\mu$ M 13c. P-STAT3 was similarly inhibited by 5  $\mu$ M Stattic. A time course treatment of HEL cells with 50  $\mu$ M 13c during indicated times, showed an inhibition of P-STAT3 as soon as 6 h. STAT3 phosphorylation at Serine 727 residue (S727) was partially inhibited by 13c 50  $\mu$ M. Indeed, partial inhibition was delayed at 72 h compared to that of Y705. This suggested that phosphorylation of tyrosine residues is more specifically affected by 13c than serine residues, which is in agreement with an effect on tyrosine kinase activity. In order to validate that P-STAT3 expression was inhibited in the nuclear fraction where it will exert its transcriptional activity, P-STAT3 expression was compared in cytoplasmic and nuclear fractions of 13c treated HEL cells. Results showed the absence of P-STAT3 expression in the cytoplasm as well as in the nucleus after treatment. Expression of  $\alpha$ -tubulin and lamin B were very low or undetectable in the nucleus and the cytoplasm fractions respectively, validating the results.

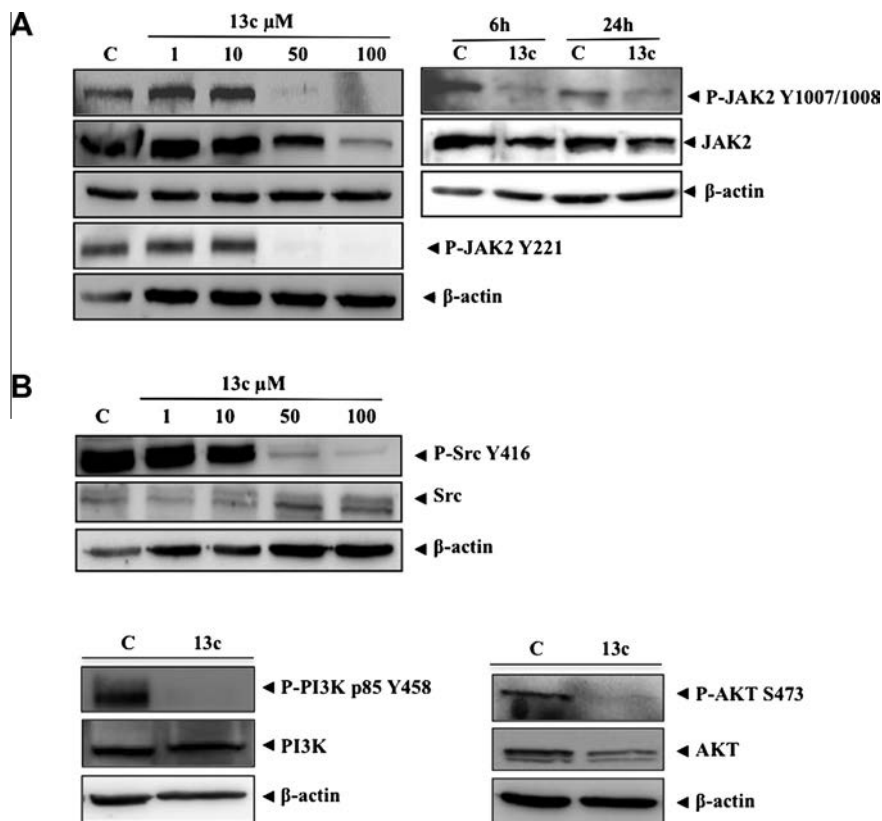
To confirm that JAK2/STAT3 signaling pathway is affected by 13c, we studied its effect on cytokine-mediated activation of STAT3 using the lung carcinoma A549 and the CML K562 cell lines. Cells were pre-treated with different concentrations of 13c for 24 h and then stimulated with IFN $\gamma$  or IL6 for 15 min, which are known to induce JAK2/STAT3 pathway. Western blot analyses showed that

cytokines induced P-STAT3 in both cell lines and that 13c was able to prevent this induction in the same range of concentration than for constitutive P-STAT3 (Fig. 2E). As a control we showed that the non-inhibitory concentration of 30  $\mu$ M 13c did not induce P-STAT3. Therefore, results clearly showed the ability of 13c to inhibit cytokine-mediated activation of STAT3 and confirmed its inhibitory effect of 13c on JAK/STAT3 pathway.

### 3.4. 13c inhibits Bcr–Abl expression in CML cells

In order to assess whether 13c has a pan inhibitory activity on constitutive tyrosine kinases, we further studied its effect on the fusion oncoprotein Bcr–Abl in two CML cell lines, K562 and MEG-01. Total expression of Bcr–Abl as well as phosphorylation status of the protein was analyzed. Cells were treated for 24 h with 1, 10 and 50  $\mu$ M 13c and results showed a downregulation of Bcr–Abl in both cell lines at 50  $\mu$ M. A pretreatment with the proteasomal inhibitor MG132 showed that the decrease in Bcr–Abl expression was not dependent on proteasomal degradation (Fig. 3A). The analysis of Bcr–Abl phosphorylation at Y245 and Y412 residues in 13c treated MEG-01 cells at 50  $\mu$ M revealed that phosphorylation decreased concomitantly with total protein expression, which occurred at 24 h (Fig. 3B). This strongly suggested that phosphorylation status is not affected prior to the down-regulation of Bcr–Abl.

To correlate 13c-mediated decrease of Bcr–Abl expression with downstream signaling we analyzed the expression of P-ERK and P-STAT5. Expression of P-ERK was clearly decreased in MEG-01 cells



**Fig. 2.** 13c inhibits kinases and STAT phosphorylation. HEL cells were treated with increasing concentrations of 13c for 72 h or with 50  $\mu$ M 13c at the indicated times. (A) Western blot analyses of P-JAK2 and JAK2 proteins were performed on the whole cell extracts using indicated antibodies. (B) Western blot analyses of P-Src, Src, P-PI3K, PI3K, P-AKT and AKT proteins were performed on the whole cell extracts using indicated antibodies. (C) Western blot analyses of P-STAT3 Y705 and S727 as well as total STAT3 were performed on whole cell extracts. (D) Western blot analyses of P-STAT3 and STAT3 proteins were performed on cytoplasmic and nuclear extracts from HEL cells treated with 50  $\mu$ M 13c for 72 h. Lamin B and  $\alpha$ -tubulin were used to verify the absence of contamination between nuclear and cytoplasmic extracts. (E) K562 and A549 cells were pre-treated with increasing concentrations of 13c for 24 h and then stimulated by IFN $\gamma$  or IL6, respectively for 15 min to activate P-STAT3. Western blot analyses of P-STAT3 Y705 as well as total STAT3 were performed on whole cell extracts. In all experiments the level of  $\beta$ -actin protein was used as loading controls. Results are representative of three independent experiments.

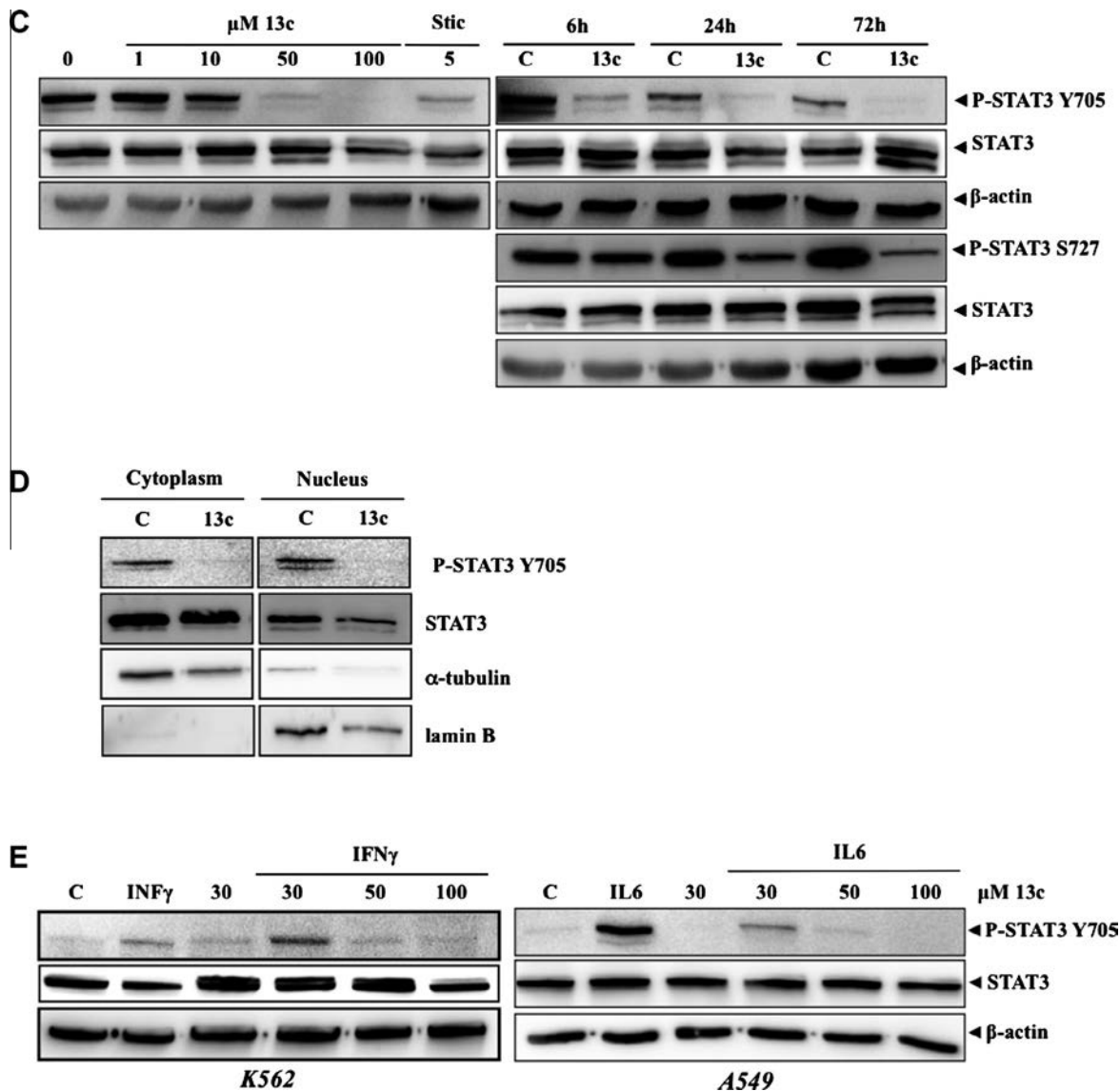


Fig. 2 (continued)

after 24 h of 13c treatment in correlation with the decrease in Bcr-Abl expression and its phosphorylated form. Similarly, constitutive expression of P-STAT5 was abolished in MEG-01 and K562 cells after 72 h of 50  $\mu\text{M}$  13c, while total STAT5 expression was not affected (Fig. 3C).

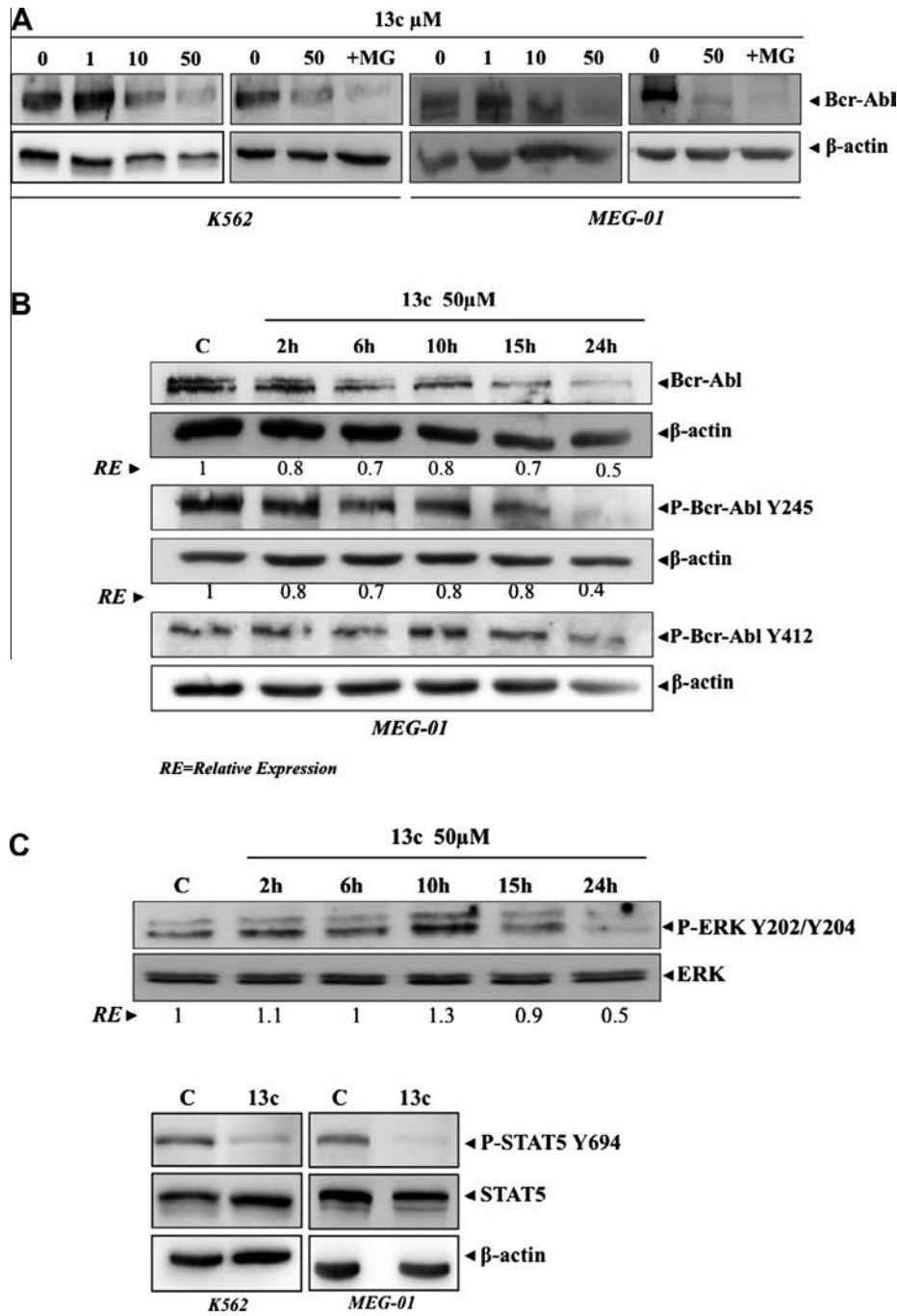
### 3.5. 13c inhibits protein phosphorylation in a phosphatase independent manner

According to the observation that 13c had an inhibitory effect on protein phosphorylation including STAT transcription factors and tyrosine kinases, the implication of phosphatases was assessed. HEL cells were treated with different concentrations of ortho-vanadate (OV), a tyrosine-phosphatase inhibitor, prior to 13c addition for 48 h. Results from western blot analysis of P-STAT3 and P-PI3K expressions revealed that OV did not prevent inhibitory activity of 13c whatever the concentration used in HEL cells (Fig. 4). This suggested that 13c-mediated inhibition of STAT and kinases in HEL cells was independent of phosphatase activation. Accordingly, the analysis of phosphatase expression in 13c-treated cells showed that PTEN, SHP1 and PP2A were partially

down-regulated after 72 h of 13c treatment (Fig. 4). Results are in favor of an inhibition of tyrosine kinase activity by 13c as previously observed *in vitro* rather than an activation of phosphatases.

### 3.6. 13c inhibits cell proliferation

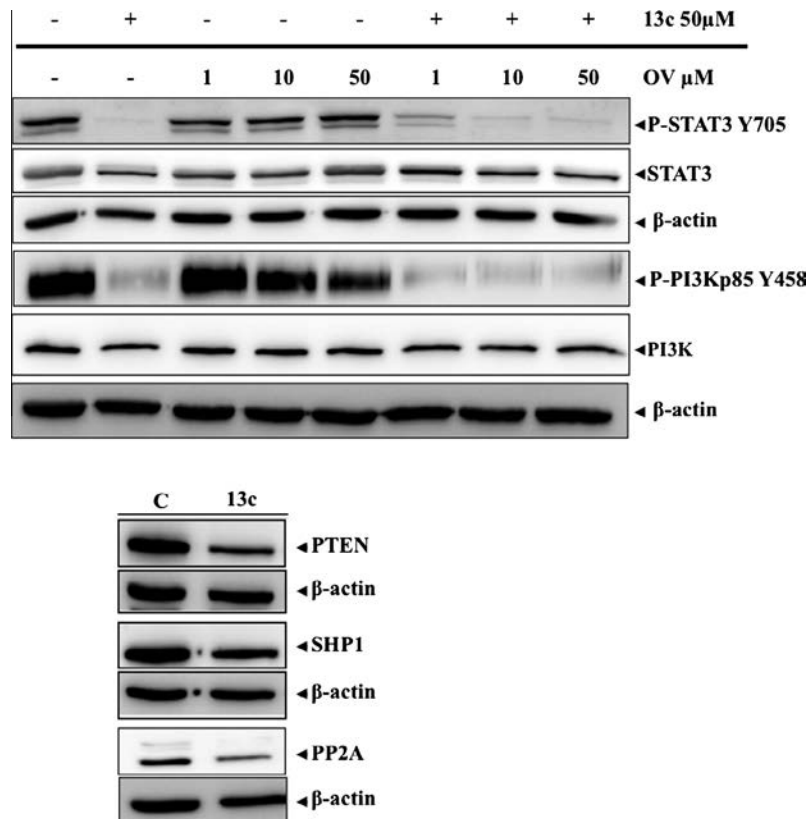
Since 13c induced inhibition of constitutive onco-kinases as well as P-STAT transcription factors, we assessed its effect on apoptosis and cell proliferation. We then studied the effect of 13c at 50  $\mu\text{M}$  on proliferation of HEL cells by Trypan blue staining as well as on the cell cycle by using the annexin V/PI assay. Results showed that cell growth was strongly inhibited as early as 48 h and reached a 3-fold decrease at 72 h of 13c treatment compared to control cells (Fig. 5A). Furthermore, 50  $\mu\text{M}$  13c affected cell cycle particularly at 72 h of treatment (Fig. 5B). While 60% of the cells were in G0/G1 phase at 48 h of 13c treatment, only 26% of the cells were in G0/G1 phase at 72 h versus 60% in the control cells. Interestingly, the rate of cells in sub-G0 phase drastically increased from 25% in control cells to 60% in 13c-treated cells at 72 h, suggesting induction of apoptosis (Fig. 5B).



**Fig. 3.** 13c inhibits Bcr–Abl, P-ERK and P-STAT5 expression. (A) K562 and MEG-01 cells were treated with or without increasing concentrations of 13c for 24 h and with 50  $\mu$ M 13c for 24 h in the presence or absence of 5  $\mu$ M MG132. Western blot analysis of Bcr–Abl protein was performed on whole cell extracts. (B) MEG-01 cells were treated with or without 50  $\mu$ M 13c for indicated times. Western blot analysis of Bcr–Abl and P-Bcr–Abl were performed on whole cell extracts using indicated antibodies. (C) MEG-01 cells were treated with or without 50  $\mu$ M 13c for indicated times. Western blot analysis of ERK and P-ERK were performed on whole cell extracts. Western blot analyses of P-STAT5 were performed on K562 and MEG-01 whole cell extracts treated with 50  $\mu$ M 13c for 24 h. In all experiments the level of  $\beta$ -actin was used as loading controls. Results are representative of three independent experiments.

To study the effect of 13c on apoptosis, HEL cells were treated with 1, 10 and 50  $\mu$ M 13c for 24 h and 72 h, and Hoechst/PI staining was performed. Observation and numeration of dead cells by fluorescent microscopy revealed that the rate of apoptotic cells increased in a concentration- and time-dependent manner. However, the percentage of apoptotic cells increased only from 19% with 1  $\mu$ M to 24% with 10  $\mu$ M 13c after 72 h vs 15% in the control cells, while 50  $\mu$ M 13c induced up to 60% apoptotic cells (Fig. 5C). These results were in agreement with the inhibition of P-STAT3 at 50  $\mu$ M 13c in these cells (Fig. 2C). 543216Treatment with 5  $\mu$ M

Stattic induced a significant increase in the rate of apoptotic HEL cells reaching 30% (Fig. 5C) and 10  $\mu$ M even led to 100% cell death (data not shown) at 72 h. Furthermore, apoptosis was also studied in A549, MEG-01 and K562 cells treated with 50  $\mu$ M 13c for 72 h. The percentage of apoptotic cells was increased up to 80% in K562 cells and 21% in MEG-01 cells, while 13c did not induce A549 cell death. Neither 13c at 100  $\mu$ M nor Stattic induced apoptosis in A549 cells for 72 h (data not shown), which do not express constitutive P-STAT3 [3]. We further investigated the effect of 13c on viability of healthy cells. PBMCs were treated with



**Fig. 4.** 13c-mediated inhibition of protein phosphorylation is independent on phosphatases. HEL cells were pre-treated for 1 h with or without increasing concentrations of the tyrosine phosphatase inhibitor, ortho-vanadate (OV) and with or without increasing concentrations of 13c for 48 h. Western blot analysis of P-STAT3, STAT3, P-PI3K, PI3K, were performed using indicated antibodies. Expression of phosphatases PTEN, SHP1 and PP2A was studied by western blot on HEL whole cell lysates after 72 h of 50 µM 13c treatment. In all experiments the level of β-actin protein was used as loading controls. Results are representative of three independent experiments.

50 µM 13c for 24, 48 and 72 h and results showed 5%, 7% and 6% of cell death respectively (Fig. 5C), witnessing excellent differential toxicity.

### 3.7. 13c inhibits c-Myc and Mcl-1 expression

To correlate P-STAT inhibition with the effect of 13c on apoptosis and proliferation, c-Myc and Mcl-1 mRNA expression were analyzed by real-time PCR in HEL cells at 24 h and MEG-01 cells at 24 h and 72 h. Results showed that STAT target gene expression was down regulated in both cell lines treated with 50 µM 13c (Fig. 5D). Decrease in c-Myc mRNA expression occurred as soon as 24 h of 13c treatment in HEL cells while it occurred at 72 h in MEG-01 cells. Moreover, the analysis of the onco-protein c-Myc and the anti-apoptotic protein Mcl-1 by western blot showed a decrease in their expression as early as 24 h of 13c treatment (Fig. 5D), with a proteasome-dependent degradation for c-Myc (Fig. S1). However, c-Myc and Mcl-1 expression did not decrease in 5 µM Stattic-treated HEL cells at 24 and 72 h, whereas P-STAT3 was inhibited at this concentration in HEL cells (Fig. 2C). Analyses of NF-κB expression in cytoplasmic and nuclear extracts of HEL and MEG-01 cells showed that NF-κBp50/p65 was not constitutively activated in these cells. The absence of NF-κB activity in MEG-01 cells was confirmed by Luciferase assays in control cells vs TNFα induced cells (Fig. S2). These results suggest that NF-κB is not involved in the constitutive expression of c-Myc and Mcl-1 genes. Furthermore, results showed that Bcl-2 expression, which was shown to involve S727 phosphorylation of STAT3, was slightly decreased after 72 h of 13c treatment in HEL cells (Fig. 5D).

### 3.8. 13c induces the intrinsic apoptosis pathway

Pro-apoptotic effect of 13c has been confirmed by studying the activation of pro-caspases and poly ADP ribose polymerase (PARP) in HEL and MEG-01 cells. Cells were treated by 50 µM 13c or 5 µM Stattic for 24 h and 72 h and the activation of pro-caspases 8, 7, 9 and 3 has been analyzed by western blot. Total protein extracts from etoposide-treated U937 cells were used as a positive control for the cleavage of the caspases. Results showed that 13c as well as Stattic had no effect on caspase 8 cleavage while caspases 7, 9 and 3 as well as PARP were cleaved in both cell lines (Fig. 5E). Results indicated that 13c induces intrinsic pathway of apoptotic cell death in these cell lines, in correlation with onco-kinase inhibition and most likely through inhibition of P-STAT3 and P-STAT5.

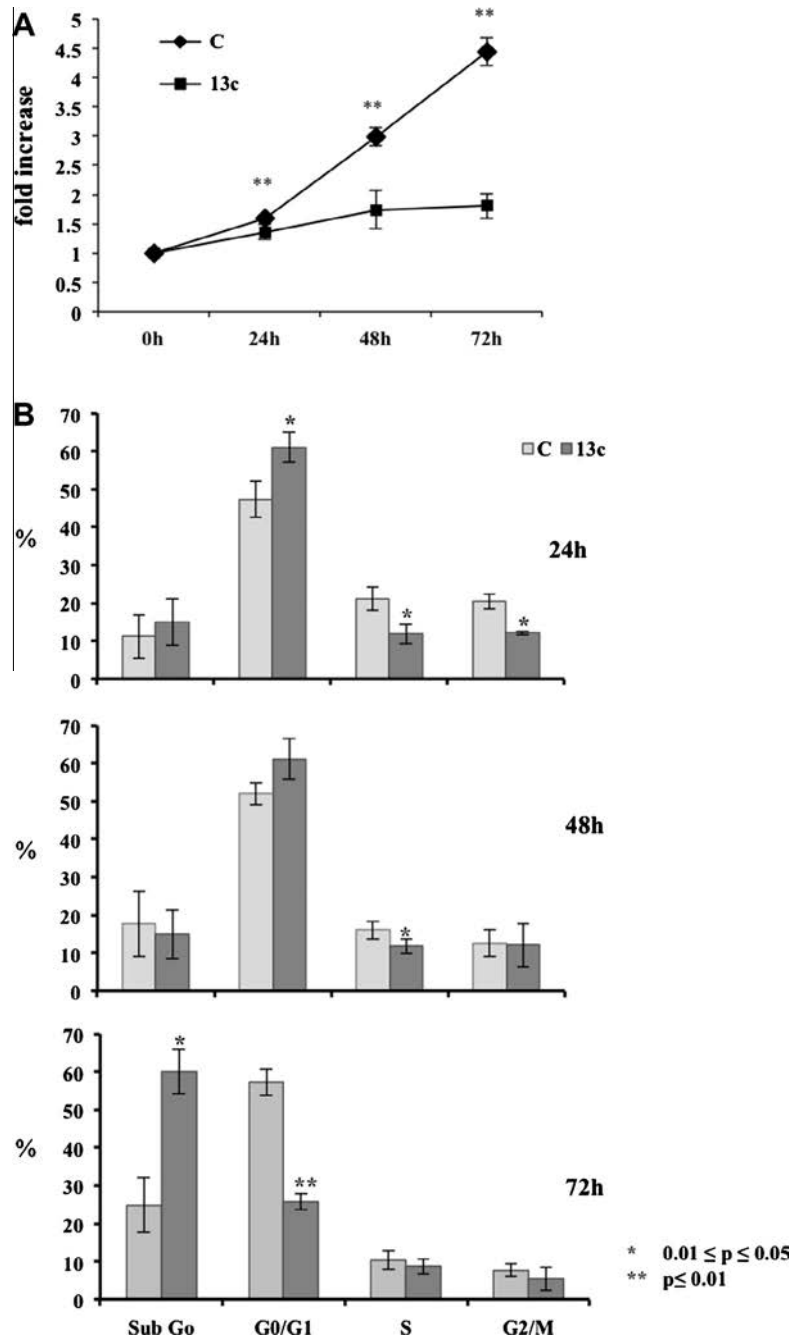
## 4. Discussion

Tri-vanillate 13c was shown to exhibit inhibitory activity on cancer cell proliferation through a cytostatic effect [23] while *in vitro* kinase assays revealed that 13c decreased the residual activity of 48 among 256 by more than 50% [3]. Many cancers result from the activation of kinases including Janus Kinase (JAK), sarcoma viral oncogene homolog (Src), fibroblast growth factor receptors (FGFR), mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK8/JNK1), epidermal growth factor receptor (EGFR) or Abelson (Abl) which were all inhibited by 13c in the *in vitro* study. Furthermore, anti-inflammatory and anti-proliferative properties of the divanillate-based polyphenol curcumin (diferuloylmethane) are mediated through the modulation of multiple cell-signaling molecules and transcription factors, including NF-κB, STAT3 and STAT5 [27,28]. According to these data, we hypothesized that 13c is able to affect

constitutively activated signaling pathways leading to cancer promotion. By establishing a network linking kinases with less than 50% residual activity to transcription factors (TF), we found that the STAT family of transcription factors (STAT1, 3, 5a and 5b) displayed the largest number of connections with kinases. This

suggested that STAT TFs were potentially impacted by 13c treatment through related kinases.

Constitutive activation of STAT family of TFs has been linked to tumor development and is now widely recognized as a cancer-promoting factor. A couple of oncogenes including kinases, such as Src,



**Fig. 5.** 13c prevents cell proliferation and induces apoptosis. HEL cells were treated with or without 50  $\mu$ M 13c for indicated times. (A) HEL cell death was evaluated by Trypan blue staining and numeration at 24, 48 and 72 h. (B) Cell cycle analysis was performed by propidium iodide staining and cytometry. (C) Cells were treated with or without different concentrations of 13c for 24 or 72 h. Graph represents the percentage of apoptotic HEL, A549, MEG-01 and K562 cells according to the time of treatment and 13c concentration. Cytotoxicity of 13c at 50  $\mu$ M on healthy cells was estimated by Trypan blue staining of PBMCs. Results are presented as the average  $\pm$  standard deviation of at least three independent experiments. (D) MEG-01 and HEL cells were treated with or without 50  $\mu$ M 13c. Total mRNA was extracted after 24 h or 72 h of MEG-01 and HEL cells treatment and mRNA expression of c-Myc and Mcl-1 genes was analyzed by Real Time PCR. Results are expressed as to the average  $\pm$  standard deviation of at least three independent experiments. Western Blot analysis of c-Myc and Mcl-1 proteins were performed on MEG-01 and HEL whole cell lysates after 24 and 72 h of treatment. (E) HEL and MEG-01 cells were treated with or without 50  $\mu$ M of 13c for 24 h and 72 h. Western blot analysis of caspases 3, 7, 8, 9 and PARP proteins were performed on the whole HEL and MEG-01 cells extracts. Treatment of U937 cells with 100  $\mu$ M etoposide was used as a positive control for pro-caspases (pro-casp) cleavage and PARP. In all experiments the level of  $\beta$ -actin protein was used as loading controls. Results are representative of three independent experiments. \* $P$  0.01  $\leq P$   $\leq$  0.05 and \*\* $P$   $\leq$  0.01 versus control group.

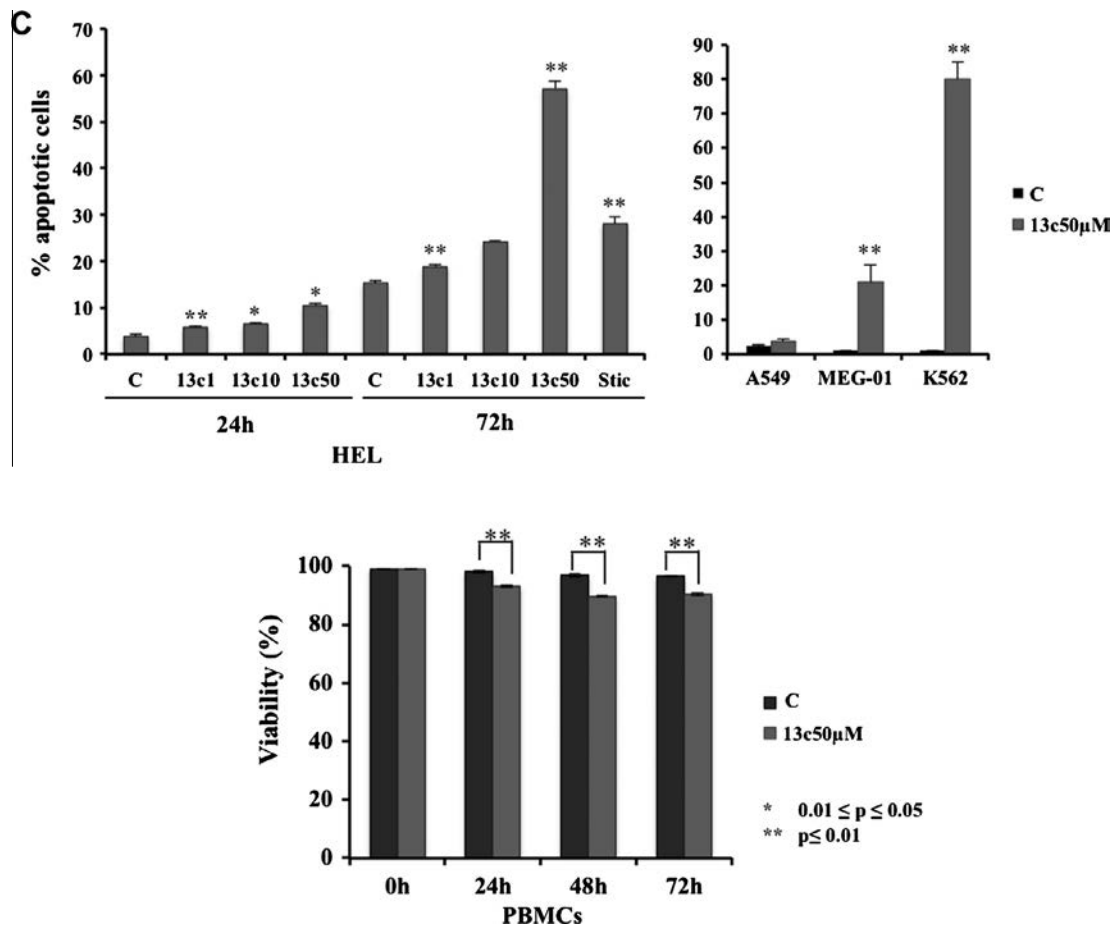


Fig. 5 (continued)

JAK, Bcr–Abl and PI3K [4,5] are able to phosphorylate and consequently activate STAT transcription factors.

To study the ability of 13c to inhibit constitutive kinase-mediated cell-signaling pathways, we used cellular models displaying constitutive activity of onco-kinases as well as constitutive expression of P-STAT. The acute myeloid leukemia (AML) HEL cell line exhibits the mutated JAK2V617F and constitutive P-STAT3, while the chronic myeloid leukemia CML K562 and MEG-01 cells express the fusion protein kinase Bcr–Abl and constitutive P-STAT5. Experimental results showed that 13c at 50 μM inhibited phosphorylation of tyrosine residues of JAK2, Src, PI3K, AKT and ERK kinases, as well as P-STAT3 and P-STAT5. Our results suggested that 13c inhibits tyrosine kinase activities in agreement with the *in vitro* kinase screen. Since the inhibition of serine phosphorylation of STAT3-S727 was only partial and delayed in HEL cells, the effect of 13c seems to discriminate tyrosine phosphorylation. Indeed, inhibition of P-STAT3-Y705 and P-JAK2-Y1007/1008 occurred as soon as 6 h and was total after 72 h of 13c 50 μM treatment as for tyrosine residues in P-Src, P-PI3K and P-ERK. Nevertheless, P-AKT-S473 was inhibited after 72 h of 13c treatment. Concerning the potential mechanism of action of 13c, the inhibition of phosphatases by orthovanadate (OV) showed that 13c-mediated inhibition of P-STAT3 was independent of phosphatases activation. Moreover, the analysis of reactive oxygen species (ROS) activation in K562 and HEL cells showed that 13c was not able to induce ROS in these cells after 2, 4 and 6 h of 13c treatment (Fig. S3) [29], when P-STAT3 is inhibited. These data were in agreement with an inhibitory effect of 13c on P-STAT3 through the inhibition of upstream kinases.

However, the inhibitory activity of 13c on tyrosine phosphorylation is not a general effect since phosphorylation of two tyrosine residues within the oncoprotein Bcr–Abl were not inhibited. Interestingly, some kinase catalytic activities were not negatively affected in the *in vitro* kinase assays, including AKT activity whereas its phosphorylation was inhibited in HEL cells. In this specific case, inhibition of P-AKT-S473 is likely a secondary effect resulting from primary inactivation of upstream kinases including the serine/threonine PI3K since phosphorylation/activation of p85 regulatory subunit was inhibited by 13c. Besides, it was also reported that Notch signaling induces activation of STAT3 in the self-renewal phase of CD34<sup>+</sup> hematopoietic cells through the JAK1/PI3K/AKT pathway [12], suggesting a role for PI3K/AKT in STAT3 activation. Similarly P-STAT3-Y705 inhibition should result from upstream inhibition of kinases JAK2 and Src, since P-JAK2 and P-STAT3 were inhibited at the same concentration (50 μM 13c) as soon as 6 h in HEL cells. Indeed, constitutive STAT activation generally results from the permanent activation of oncogenic tyrosine kinases [4,5]. JAK2V617F mutation triggers constitutive expression of P-STAT3-Y705 and resistance to pro-apoptotic stimuli [30]. Y1007/1008 residues are located in the catalytic pocket of JAK2 and the Y221 residue is involved in the enzymatic activity of the protein [31]. As phosphorylation is critical for JAK2 activity, 13c-mediated inhibition of these Y-residues consequently leads to inactivation of substrates including STAT. Inhibition of JAK2 could not be substituted by P-Src which was also inhibited by 13c. Moreover, the down-regulation of Bcr–Abl in MEG-01 and K562 cells was correlated to inhibition of constitutive P-STAT5 as well as P-ERK in these cells. Bcr–Abl activates the extra cellular sig-

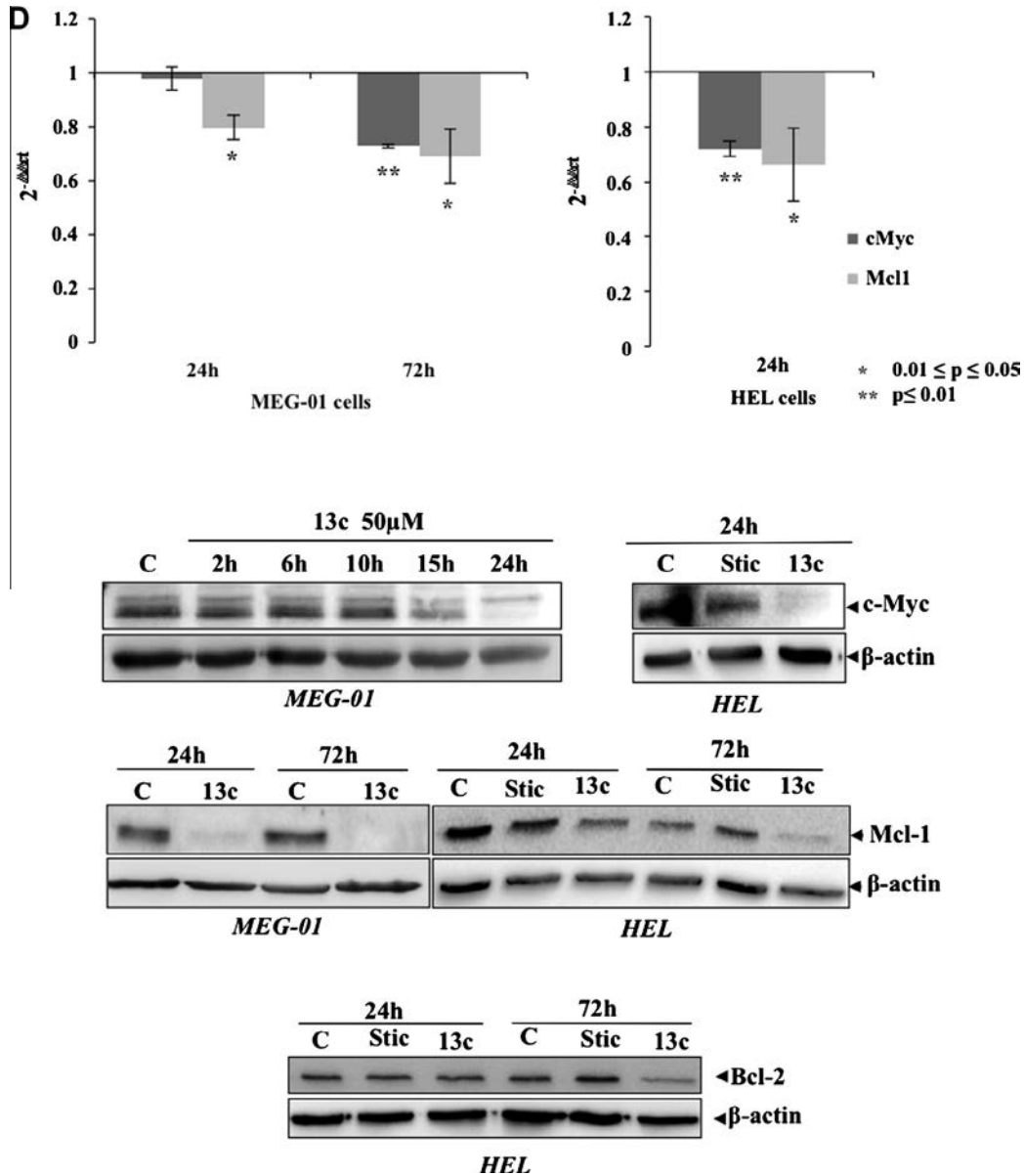


Fig. 5 (continued)

nal-regulated kinase (ERK)1/2 translocation to the nucleus through the Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway leading to the phosphorylation of many proteins involved in cell proliferation such as STAT factors and c-myc. Quantification of immuno-blot showed that Bcr-Abl expression was decreased after 24 h of 13c 50 μM treatment in K562 and MEG-01 cells. Conversely, apparent inhibition of Y245 and Y412 phosphorylation was concomitant with Bcr-Abl down-regulation. This suggested that 13c does not affect catalytic activity of the tyrosine kinase since Y245 and Y412 residues are involved in Abl kinase activity [32,33]. These results show that 13c is not able to inhibit Y-residue phosphorylation in all proteins. However, it is able to down-regulate the onco-kinase Bcr-Abl, since proteasomal degradation is not involved and the expression of the chaperone protein HSP90 was not affected (data not shown) [34]. Bcr-Abl inhibitor Imatinib blocks kinase activity through competition with ATP [35] while HSP90 inhibitors such as geldanamycin or radicicol lead to Bcr-Abl degradation [36,37]. The mechanism by which 13c inhibits Bcr-Abl expression has not been described yet but seems different from these inhibitors. Regarding results related to proteasomal degradation, Y-residues phosphory-

lation in Bcr-Abl protein as well as HSP90 expression, it is likely that 13c down-regulates Bcr-Abl at the transcriptional level.

Permanent activation of STAT leads to oncogenesis through the upregulation of target genes such as cyclin D1/D2, c-Myc, Bcl-xL and Mcl-1 among others contributing to the activation of cell cycle and inhibition of apoptosis [5,6]. Inhibition of STAT phosphorylation by 13c led to the absence of P-STAT in the nucleus as shown for STAT3 in HEL cells, suggesting that 13c affects STAT transcriptional activities. This was assessed by real-time PCR analyses of c-Myc and Mcl-1 gene expression.

Nevertheless, c-Myc protein expression was decreased in MEG-01 cells after 24 h of treatment while mRNA expression was not inhibited at this time. Results showed that 13c induced a decrease in c-Myc expression due to proteasome-dependent degradation (Fig. S1). This was in agreement with Bcr-Abl downregulation as c-Myc can be activated directly by ABL SH2 region [38] but also by Bcr-Abl/P-ERK pathway [39]. Moreover, dephosphorylation of c-Myc triggers its destabilization through degradation by the proteasome [40]. Bcl-2 protein expression was partially inhibited after 72 h in correlation with the low inhibitory effect on P-STAT3 S727.



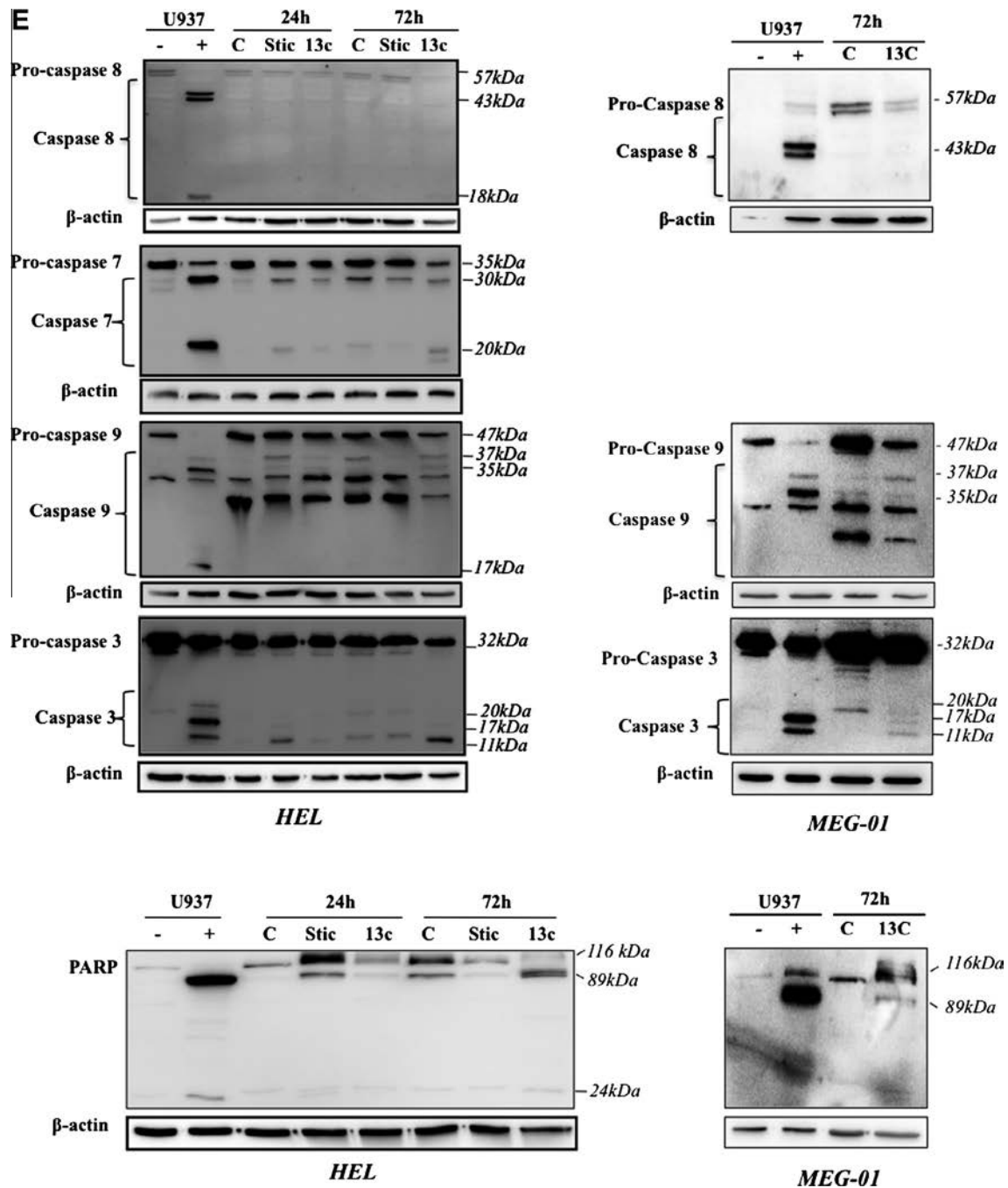


Fig. 5 (continued)

Bcl-2 gene has been identified as regulated by STAT3 involving S727 phosphorylation [41].

Inhibition of constitutive P-STAT was in agreement, on one side with down-regulation of these genes and, on the other side, to the pro-apoptotic effect of 13c in cells expressing constitutive STAT3 or STAT5. Interestingly, 13c was not able to induce apoptosis in the lung carcinoma A549 cell line, which does not express constitutive P-STAT3 and STAT5 (data not shown). This suggested that 13c-mediated apoptosis is dependent on P-STAT inhibition and occurs through inhibition of anti-apoptotic stimuli. Nevertheless, the specific inhibitor of P-STAT3 Stattic, did not inhibit Mcl1 nor c-myc expression, suggesting that 13c affects gene expression not only through P-STAT inhibition but potentially through other TF includ-

ing NF- $\kappa$ B. However, Stattic inhibitory effect on P-STAT3 was less efficient than 13c, which could consequently have a lower effect on STAT3 target genes. Analyses of NF- $\kappa$ B expression in HEL and MEG-01 cells by western blot and Luciferase assays showed that this transcription factor, which also regulates these genes, was not constitutively activated in these cells. This evidenced that 13c cannot exert its inhibitory effect through NF- $\kappa$ B activity.

13c was also able to inhibit IL6- and INF $\gamma$ -mediated expression of P-STAT3 in A549 and K562 cells respectively. This suggested that 13c could also prevent cytokine-mediated activation of STAT in cancer cells with pathological overexpression of cytokines and/or deregulation of receptors that play critical roles. In this regard, leptin activates JAK2/STAT3 signaling pathway among others in

various cancers [42] and IL6 and TNF $\alpha$  signaling pathways lead to TNFR2 overexpression via STAT3 activation in colon cancer cells [43].

Besides the pro-apoptotic activity of this polyphenol, results support the hypothesis that P-STAT3 and P-STAT5 inactivation represents a likely therapeutic target when constitutively active in cancer cells such as in JAK2V617F and Bcr–Abl positive cells. Moreover, inhibiting activated kinases in cancer patients has proved its efficiency since several years with Bcr–Abl inhibitors (Imatinib, Dasatinib), whereas appearance of resistance to these drugs constrain to the development of new molecules exhibiting different mechanisms of action. However, new promising and approved molecules also inhibit Bcr–Abl mainly through ATP competition [44]. JAK inhibitors were also recently approved such as the selective inhibitor of JAK1/2 ruxolitinib (Jakafi) as well as the pan-JAK inhibitor tofacitinib (Xeljanz) among others [45,46]. The polyphenol 13c or derivatives could represent good candidates as kinase inhibitors. In addition, 13c showed a significant *in vivo* anticancer activity in the aggressive B16F10 lung pseudometastatic mouse model [3] indicating a wide spectrum of action for this polyphenol compound. Altogether, results argue in favor of the future use of 13c and tri-vanillate derivatives in anticancer clinical trials.

### Conflict of Interest

None.

### Acknowledgements

A.T., A.G., S.C. and C.G. are supported by Télévie grants (Fonds National de la Recherche Scientifique, Belgium). Research at the Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) is financially supported by “Recherche Cancer et Sang” foundation, by «Recherches Scientifiques Luxembourg» asbl, by «Een Häerz fir Kriibskrank Kanner» association, the Action Lions “Vaincre le Cancer” Luxembourg, The Fonds National de la Recherche Luxembourg, Télévie Luxembourg and the Foundation for Scientific Cooperation between Germany and Luxemburg for additional support. Further support was received from the European Union (ITN “RedCat” 215009 and Interreg IVa project “Corena”). MD is supported by the National Research Foundation (NRF) by the MEST of Korea for Tumor Microenvironment Global Core Research Center (GCRC) grant, [grant number 2012-0001184]; by the Seoul National University Research grant and by the Research Settlement Fund for the new faculty of SNU. The authors thank Robert Kiss, Alexandra Ionescu and Delphine Lamoral-Theys for their efficient contribution.

### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.06.023>.

### References

- [1] C. Giovannini, R. Masella, Role of polyphenols in cell death control, *Nutr. Neurosci.* 15 (2012) 134–149.
- [2] T. Esatbeyoglu, P. Huebbe, I.M. Ernst, D. Chin, A.E. Wagner, G. Rimbach, Curcumin – from molecule to biological function, *Angew. Chem.* 51 (2012) 5308–5332.
- [3] D. Lamoral-Theys, N. Wauthoz, P. Heffeter, V. Mathieu, U. Jungwirth, F. Lefranc, J. Neve, J. Dubois, F. Dufresne, K. Amighi, W. Berger, P. Gailly, R. Kiss, Trivanillic polyphenols with anticancer cytostatic effects through the targeting of multiple kinases and intracellular Ca(2+) release, *J. Cell. Mol. Med.* (2011).
- [4] R.L. Ilaria Jr., R.A. Van Etten, P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 31704–31710.
- [5] Y. Ozawa, A.H. Williams, M.L. Estes, N. Matsushita, F. Boschelli, R. Jove, A.F. List, Src family kinases promote AML cell survival through activation of signal transducers and activators of transcription (STAT), *Leuk. Res.* 32 (2008) 893–903.
- [6] P.K. Epling-Burnette, J.H. Liu, R. Catlett-Falcone, J. Turkson, M. Oshiro, R. Kothapalli, Y. Li, J.M. Wang, H.F. Yang-Yen, J. Karras, R. Jove, T.P. Loughran Jr., Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 351–362.
- [7] A. Trécul, F. Morceau, M. Dicato, M. Diederich, Dietary compounds as potent inhibitors of the signal transducers and activators of transcription (STAT) 3 regulatory network, *Genes Nutr.* 7 (2012) 111–125.
- [8] E.J. Baxter, L.M. Scott, P.J. Campbell, C. East, N. Fourouclas, S. Swanton, G.S. Vassiliou, A.J. Bench, E.M. Boyd, N. Curtin, M.A. Scott, W.N. Erber, A.R. Green, P. Cancer Genome, Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders, *Lancet* 365 (2005) 1054–1061.
- [9] C. James, V. Ugo, N. Casadevall, S.N. Constantinescu, W. Vainchenker, A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects, *Trends Mol. Med.* 11 (2005) 546–554.
- [10] R. Kralovics, R.C. Skoda, Molecular pathogenesis of Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disorders, *Blood Rev.* 19 (2005) 1–13.
- [11] R.L. Levine, M. Loriaux, B.J. Huntly, M.L. Loh, M. Beran, E. Stoffregen, R. Berger, J.J. Clark, S.G. Willis, K.T. Nguyen, N.J. Flores, E. Estey, N. Gattermann, S. Armstrong, A.T. Look, J.D. Griffin, O.A. Bernard, M.C. Heinrich, D.G. Gilliland, B. Druker, M.W. Deininger, The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 106 (2005) 3377–3379.
- [12] B. Choi, E. Chun, S.Y. Kim, M. Kim, K.Y. Lee, S.J. Kim, Notch-induced hIL-6 production facilitates the maintenance of self-renewal of hCD34+ cord blood cells through the activation of Jak-PI3K-STAT3 pathway, *Am. J. Pathol.* 180 (2012) 351–364.
- [13] F.M. Gu, Q.L. Li, Q. Gao, J.H. Jiang, X.Y. Huang, J.F. Pan, J. Fan, J. Zhou, Sorafenib inhibits growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by blocking STAT3, *World J. Gastroenterol.* 17 (2011) 3922–3932.
- [14] K. Spiekermann, S. Biethahn, S. Wilde, W. Hiddemann, F. Alves, Constitutive activation of STAT transcription factors in acute myelogenous leukemia, *Eur. J. Haematol.* 67 (2001) 63–71.
- [15] J.E. Cortes, M. Talpaz, M. Beran, S.M. O'Brien, M.B. Rios, S. Stass, H.M. Kantarjian, Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia with rearrangement of the breakpoint cluster region. Long-term follow-up results, *Cancer* 75 (1995) 464–470.
- [16] R.M. Arana-Trejo, E. Ruiz Sanchez, G. Ignacio-Ibarra, E. Baez de la Fuente, O. Garces, E. Gomez Morales, M. Castro Granados, R. Ovilla Martinez, M.E. Rubio-Borja, L. Solis Anaya, P. Herrera, J. Delgado Llamas, S. Kofman, BCR/ABL p210, p190 and p230 fusion genes in 250 Mexican patients with chronic myeloid leukaemia (CML), *Clin. Lab. Haematol.* 24 (2002) 145–150.
- [17] O. Hantschel, B. Nagar, S. Guettler, J. Kretzschmar, K. Dorey, J. Kuriyan, G. Superti-Furga, A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl, *Cell* 112 (2003) 845–857.
- [18] M.W. Deininger, J.M. Goldman, J.V. Melo, The molecular biology of chronic myeloid leukemia, *Blood* 96 (2000) 3343–3356.
- [19] N. Chatain, P. Ziegler, D. Fahrenkamp, E. Jost, R. Moriggi, H. Schmitz-Van de Leur, G. Muller-Newen, Src family kinases mediate cytoplasmic retention of activated STAT5 in BCR-ABL-positive cells, *Oncogene* (2012).
- [20] A. Hoelbl, C. Schuster, B. Kovacic, B. Zhu, M. Wickre, M.A. Hoelzl, S. Fajmann, F. Grebien, W. Warsch, G. Stengl, L. Hennighausen, V. Poli, H. Beug, R. Moriggi, V. Sexl, Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia, *EMBO Mol. Med.* 2 (2010) 98–110.
- [21] C. Walz, W. Ahmed, K. Lazarides, M. Betancur, N. Patel, L. Hennighausen, V.M. Zaleskas, R.A. Van Etten, Essential role for Stat5a/b in myeloproliferative neoplasms induced by BCR-ABL1 and JAK2(V617F) in mice, *Blood* 119 (2012) 3550–3560.
- [22] P. Chaturvedi, S. Sharma, E.P. Reddy, Abrogation of interleukin-3 dependence of myeloid cells by the v-src oncogene requires SH2 and SH3 domains which specify activation of STATs, *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) 3295–3304.
- [23] D. Lamoral-Theys, L. Pottier, F. Kerff, F. Dufresne, F. Proutiere, N. Wauthoz, P. Neven, L. Ingrassia, P.V. Antwerpen, F. Lefranc, M. Gelbcke, B. Pirotte, J.L. Kraus, J. Neve, A. Kornienko, R. Kiss, J. Dubois, Simple di- and trivanillates exhibit cytostatic properties toward cancer cells resistant to pro-apoptotic stimuli, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 3823–3833.
- [24] E. Schreiber, P. Matthias, M.M. Müller, W. Schaffner, Rapid detection of octamer binding proteins with ‘mini-extracts’, prepared from a small number of cells, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 6419.
- [25] J. Gao, A.S. Ade, V.G. Tarcea, T.E. Weymouth, B.R. Mirel, H.V. Jagadish, D.J. States, Integrating and annotating the interactome using the MiMI plugin for cytoscape, *Bioinformatics* 25 (2009) 137–138.
- [26] P. Shannon, A. Markiel, O. Ozier, N.S. Baliga, J.T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, T. Ideker, Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks, *Genome Res.* 13 (2003) 2498–2504.

- [27] R. Blasius, S. Reuter, E. Henry, M. Dicato, M. Diederich, Curcumin regulates signal transducer and activator of transcription (STAT) expression in K562 cells, *Biochem. Pharmacol.* 72 (2006) 1547–1554.
- [28] A. Duvoix, F. Morceau, S. Delhalle, M. Schmitz, M. Schneckeburger, M.M. Galteau, M. Dicato, M. Diederich, Induction of apoptosis by curcumin: mediation by glutathione S-transferase P1–1 inhibition, *Biochem. Pharmacol.* 66 (2003) 1475–1483.
- [29] K. Boengler, E. Ungefug, G. Heusch, R. Schulz, The STAT3 inhibitor Stattic Impairs cardiomyocyte mitochondrial function through increased reactive oxygen species formation, *Curr. Pharm. Des.* (2013).
- [30] W. Zhao, T. Zhang, B. Qu, X. Wu, X. Zhu, F. Meng, Y. Gu, Y. Shu, Y. Shen, Y. Sun, Q. Xu, Sorafenib induces apoptosis in HL60 cells by inhibiting Src kinase-mediated STAT3 phosphorylation, *Anticancer Drugs* 22 (2011) 79–88.
- [31] L.S. Argetsinger, J.L. Kouadio, H. Steen, A. Stensballe, O.N. Jensen, C. Carter-Su, Autophosphorylation of JAK2 on tyrosines 221 and 570 regulates its activity, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 4955–4967.
- [32] B.B. Brasher, R.A. Van Etten, C-Abl has high intrinsic tyrosine kinase activity that is stimulated by mutation of the Src homology 3 domain and by autophosphorylation at two distinct regulatory tyrosines, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 35631–35637.
- [33] H. Pluk, K. Dorey, G. Superti-Furga, Autoinhibition of c-Abl, *Cell* 108 (2002) 247–259.
- [34] A. Maloney, P. Workman, HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds, *Expert Opin. Biol. Ther.* 2 (2002) 3–24.
- [35] B. Nagar, O. Hantschel, M.A. Young, K. Scheffzek, D. Veach, W. Bornmann, B. Clarkson, G. Superti-Furga, J. Kuriyan, Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase, *Cell* 112 (2003) 859–871.
- [36] F. Morceau, I. Buck, M. Dicato, M. Diederich, Radicicol-mediated inhibition of Bcr-Abl in K562 cells induced p38-MAPK dependent erythroid differentiation and PU.1 down-regulation, *Biofactors* 34 (2008) 313–329.
- [37] R. Nimmanapalli, E. O'Bryan, K. Bhalla, Geldanamycin and its analogue 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin lowers Bcr-Abl levels and induces apoptosis and differentiation of Bcr-Abl-positive human leukemic blasts, *Cancer Res.* 61 (2001) 1799–1804.
- [38] C.L. Sawyers, W. Callahan, O.N. Witte, Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes, *Cell* 70 (1992) 901–910.
- [39] F. Chang, L.S. Steelman, J.T. Lee, J.G. Shelton, P.M. Navolanic, W.L. Blalock, R.A. Franklin, J.A. McCubrey, Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention, *Leukemia* 17 (2003) 1263–1293.
- [40] M.R. Junttila, P. Puustinen, M. Niemela, R. Ahola, H. Arnold, T. Bottzauw, R. Alahalo, C. Nielsen, J. Ivaska, Y. Taya, S.L. Lu, S. Lin, E.K. Chan, X.J. Wang, R. Grenman, J. Kast, T. Kallunki, R. Sears, V.M. Kahari, J. Westermarck, CIP2A inhibits PP2A in human malignancies, *Cell* 130 (2007) 51–62.
- [41] H.J. Choi, J.S. Han, Overexpression of phospholipase D enhances Bcl-2 expression by activating STAT3 through independent activation of ERK and p38MAPK in HeLa cells, *Biochim. Biophys. Acta* 2012 (1823) 1082–1091.
- [42] L. Jiang, Z. Li, L. Rui, Leptin stimulates both JAK2-dependent and JAK2-independent signaling pathways, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 28066–28073.
- [43] K.E. Hamilton, J.G. Simmons, S. Ding, L. Van Landeghem, P.K. Lund, Cytokine induction of tumor necrosis factor receptor 2 is mediated by STAT3 in colon cancer cells, *Mol. Cancer Res.* 9 (2011) 1718–1731.
- [44] A.J. Lamontanara, E.B. Gencer, O. Kuzyk, O. Hantschel, Mechanisms of resistance to BCR-ABL and other kinase inhibitors, *Biochim. Biophys. Acta* (2012).
- [45] B.W. Dymock, C.S. See, Inhibitors of JAK2 and JAK3: an update on the patent literature 2010–2012, *Expert Opin. Ther. Pat.*, (2013).
- [46] S. Verstovsek, Ruxolitinib: an oral Janus kinase 1 and Janus kinase 2 inhibitor in the management of myelofibrosis, *Postgrad. Med.* 125 (2013) 128–135.



## Research review paper

# Natural compounds and pharmaceuticals reprogram leukemia cell differentiation pathways



Franck Morceau<sup>a</sup>, Sébastien Chateauvieux<sup>a</sup>, Marion Orsini<sup>a</sup>, Anne Trécul<sup>a</sup>, Mario Dicato<sup>a</sup>, Marc Diederich<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, 9, rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg

<sup>b</sup> College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 24 December 2014

Received in revised form 18 March 2015

Accepted 29 March 2015

Available online 14 April 2015

## Keywords:

Differentiation therapy

Cancer

Leukemia

Gene expression

Natural compounds

Drug development

## ABSTRACT

In addition to apoptosis resistance and cell proliferation capacities, the undifferentiated state also characterizes most cancer cells, especially leukemia cells. Cell differentiation is a multifaceted process that depends on complex regulatory networks that involve transcriptional, post-transcriptional and epigenetic regulation of gene expression. The time- and spatially-dependent expression of lineage-specific genes and genes that control cell growth and cell death is implicated in the process of maturation. The induction of cancer cell differentiation is considered an alternative approach to elicit cell death and proliferation arrest. Differentiation therapy has mainly been developed to treat acute myeloid leukemia, notably with all-trans retinoic acid (ATRA). Numerous molecules from diverse natural or synthetic origins are effective alone or in association with ATRA in both in vitro and in vivo experiments. During the last two decades, pharmaceuticals and natural compounds with various chemical structures, including alkaloids, flavonoids and polyphenols, were identified as potential differentiating agents of hematopoietic pathways and osteogenesis.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Contents

1. Introduction . . . . .	786
1.1. Differentiation therapy . . . . .	786
1.2. Hematopoiesis regulation . . . . .	786
2. Induction of myeloid differentiation in acute myeloid leukemia cells . . . . .	787
2.1. Acute myeloid leukemia features . . . . .	787
2.2. Acute myeloid leukemia cells differentiation . . . . .	787
3. Induction of chronic myeloid leukemia cell differentiation . . . . .	790
3.1. Chronic myeloid leukemia . . . . .	790
3.2. Induction of CML cell erythroid differentiation . . . . .	791
4. Multiple myeloma and osteoblastic targets . . . . .	792
5. Discussion and conclusion . . . . .	792
Acknowledgments . . . . .	794
References . . . . .	794

**Abbreviations:** ABL, Abelson; ALL, acute lymphocytic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; APL, acute promyelocytic leukemia; BC, blast crisis; BCR, breakpoint cluster region; BMP, bone morphogenetic protein; CBP, CREB-binding protein; CDK, cyclin dependent kinase; CEBP $\alpha$ , CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$ ; CFU-E, colony forming units-erythroid; CLL, chronic lymphocytic leukemia; CML, chronic myeloid leukemia; EpoR, erythropoietin receptor; ETO, eight twenty-one; ETS, E26 transformation-specific; 5-FU, 5-fluorouracil; FDA, food and drug administration; FGF, fibroblast growth factor; FLT3, FMS-like tyrosine kinase 3; FOG-1, friend of GATA-1; GABA, gamma amino butyric acid; GABP $\alpha$ , GA binding protein alpha; GP, glycoprotein; GPA, glycophorin A; GTP, guanosine triphosphate; HDAC, histone deacetylase; Hh, hedgehog; hMSC, human mesenchymal stem cell; HSC, hematopoietic stem cells; HSP, heat-shock protein; IFN, interferon; IL, interleukin; IRF-1, interferon regulatory factor; JAK, Janus kinase; LDB1, Lim domain-binding protein; LMO2, Lim-only protein 2; lncRNA, long non-coding RNA; MAPK, mitogen-activated protein kinase; miR, microRNA; MM, multiple myeloma; NBT, nitro-blue tetrazolium chloride; NF-E2, nuclear factor-erythroid 2; NuRD, nucleosome remodeling and deacetylase; PBGD, porphobilinogen deaminase; PI3K, phosphoinositide 3 kinase; PKC, protein kinase C; PLSCR1, phospholipid scramblase 1; PML-RAR $\alpha$ , promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor  $\alpha$ ; PPIase, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase; PRMT1, protein arginine N-methyltransferase 1; RANKL, receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand; RBP, RNA-binding protein; RUNX, runt-related transcription factor; RXR, retinoid-X-receptor; STAT, signal transducer and activator of transcription; Tal-1, T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1; TG $\beta$ 3, transforming growth factor beta; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; VD3, 1,25-dihydroxyvitamin D3; VDR, vitamin D3 receptor; VPA, valproic acid; WHO, World Health Organization.

\* Corresponding author. Tel.: +82 2 880 8919.

E-mail address: [marcdiederich@snu.ac.kr](mailto:marcdiederich@snu.ac.kr) (M. Diederich).

## 1. Introduction

Acquiring a specific cell function likely constitutes one of the most complex biological processes. Cell differentiation requires the accurate and coordinated regulation of the expression of many genes at the spatial and temporal levels. In addition to the control of the expression of specific genes, the management of cell proliferation and survival is crucial to generate functional cells. All biomolecules that exist in a cell are involved in differentiation processes, including transcription and chromatin remodeling factors, as well as non-coding RNAs such as micro(mi)RNAs and long non-coding (lnc)RNAs, which interact in a very complex regulatory network that manages gene expression. Together, the effectors of cell regulation interact and lead to the ultimate stage of differentiation in a stepwise manner.

### 1.1. Differentiation therapy

In addition to the deregulation of cell proliferation and survival, the consecutive absence of normal differentiation characterizes most malignant cells. Therefore, the molecular mechanisms involved in the differentiation process have been considered a potential therapeutic target in tumor cells. Pre-clinical models were developed as early as the 1980s (Reiss et al., 1986), and the concept of concomitantly inducing cancer cell differentiation and cell proliferation arrest has become an alternative to cytotoxic chemotherapies. The aim was to modulate signaling pathways and the expression of specific genes to lead cancer cells towards a more advanced stage of differentiation and invert the growth/differentiation plot. Rather than killing cells via the activities of cytotoxic and unselective drugs, this therapy aimed to reprogram malignant and useless cells into functional ones using subtoxic doses of differentiating agents. The induction of tumor cell differentiation has been shown to be effective in the *in vitro* and *in vivo* treatments of several types of cancer cells (Leszczyniecka et al., 2001), and differentiation-inducing therapy was recently proposed to treat malignant gliomas (Liu et al., 2010). A variety of compounds that can induce cancer cell differentiation have been reported for three decades. Compounds with various molecular structures, including retinoic acid (Breitman et al., 1980; Castaigne et al., 1990), butyrate derivatives (Newmark et al., 1994), dimethyl sulfoxide (Breitman, Selonick, 1980), and anthracyclines (Morceau et al., 1996a; Sato et al., 1992; Trentesaux et al., 1993), displayed differentiation activities *in vitro* in leukemia cells via diverse mechanisms of action. The primary effective compounds, described as differentiation-inducing agents, were vitamin D derivatives, retinoid, interferon and polar-planar compounds. Most of these molecules were particularly active on myeloid leukemia cells, which differentiated into morphologically and functionally mature cells (Paquette and Koeffler, 1992).

Leukemia is a cancer that affects the blood, bone marrow and lymphoid system as well as the differentiation of normal hematopoietic cells. Four main types of leukemia have been determined based on the cell lineage transformation and clinical features, namely acute myeloid leukemia (AML), chronic myeloid leukemia (CML), acute lymphocytic leukemia (ALL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL). Moreover, a group of French, American and British (FAB) hematologists divided acute leukemia into subtypes; in 1976, this effort led to a classification based on the quantification of blasts, their degree of maturity and the identification of chromosomal abnormalities. Later, the World Health Organization (WHO) established a new classification based on the FAB guidelines, and this classification considered morphology as well as cytogenetic, molecular genetic, gene mutation and clinical features (Rulina et al., 2010). Molecular and cellular features in leukemia cells result from the perturbation of the normal hematopoiesis regulatory network.

### 1.2. Hematopoiesis regulation

Hematopoiesis is a process that leads to the continuous production and replacement of all blood cells. During embryogenesis, hematopoiesis takes place in the blood islands of the yolk sac and in the liver, spleen and lymph nodes. In adults, it occurs only in the bone marrow of sternal bones, the iliac crest and the femoral head. A small population of bone marrow cells, hematopoietic stem cells (HSC), produces hematopoietic cells in adults. HSCs are undifferentiated and multipotent cells with an increased capacity for self-renewal, proliferation and differentiation.

Most blood cells are highly differentiated with reduced protein synthesis and cell division capacity. Their lifetime varies from a few hours for neutrophils and few days for platelets to several weeks for red blood cells. Blood cells are the terminal and functional elements of the two major hematopoietic lineages, lymphoid and myeloid. The different hematopoietic cells proliferate, differentiate and complete their maturation in the bone marrow prior to entering the bloodstream and exert their function in tissues. T cells are an exception because they mature in the thymus, lymph nodes and spleen.

The regulation of the self-renewal, proliferation and differentiation of these cells involves cell–cell interactions with stromal cells from the bone marrow as well as multiple types of molecules that act in a time- and concentration-dependent manner, including cytokines, chemokines, growth factors and transcription factors (Broxmeyer et al., 1989, 2005; Wickrema and Crispino, 2007), as well as miRNAs (Mathieu and Ruohola-Baker, 2013). The following description of hematopoiesis regulation is not exhaustive because only the versatile roles of some transcription factors are shown. The deregulation of this network clearly perturbs hematopoiesis, which leads to hematological disorders, including leukemia. The GATA family of transcription factors has emerged as an essential regulator of gene expression in the different hematopoietic cell types. Three of the six members, GATA-1, GATA-2 and GATA-3, are expressed and functional in hematopoietic cells, whereas GATA-4, GATA-5 and GATA-6 are expressed in different tissues derived from the mesoderm and endoderm, such as the heart, liver, lung, gonads, and intestine (Molkentin, 2000). GATA-1 plays a crucial role in the suitable development of erythroid cells, especially during the later stages (Pevny et al., 1995), as well as during the differentiation of megakaryocytes, eosinophils and mast cells (Harigae et al., 1998; Hirasawa et al., 2002; Romeo et al., 1990). This zinc finger protein contains a N-terminal region, which confers transcriptional activity, and a C-terminal domain that allows binding to DNA and other proteins. GATA transcription factors specifically recognize the G/A/T/A sequence in the *cis*-regulatory regions of genes. GATA-binding sites are largely represented in most erythroid-related promoter/enhancer genes, including globins, heme metabolism enzymes, glycophorine A (GPA) and erythropoietin receptor (EpoR), as well as in the anti-apoptotic Bcl-xL gene (Gregory et al., 1999). Moreover, GATA-binding sites are present in the promoters of genes that are specifically involved in megakaryocyte differentiation, such as CD42a/glycoprotein (GP)9, GP2b and the thrombopoietin receptor CD110/c-Mpl (Szalai et al., 2006). GATA-1 can interact with other nuclear proteins via its C-terminal domain, resulting in the activation or repression of target gene expression in erythroid (Song et al., 2004) and megakaryocytic (Elagib et al., 2003) differentiation. The interaction of GATA-1 with its cofactor “Friend of GATA” (FOG)-1 is essential for the success of erythropoiesis and megakaryopoiesis (Dore and Crispino, 2011; Tsang et al., 1997). Other studies have shown that a factor involved in chromatin remodeling, NuRD, interacts with the N-terminus of FOG-1 and that this interaction is important for the activation or repression of genes regulated by the GATA-1/FOG-1 complex (Miccio et al., 2010; Vicente et al., 2012). The interaction between GATA-1 and NuRD/FOG-1 is required for the proper development of megakaryocytes. In addition to FOG-1, many proteins interact and form complexes around GATA-1 to modulate its transcriptional activity. LMO2 (Lim-only protein 2) is a “zinc finger”

protein that can interact with GATA-1, Tal-1 (T-cell acute lymphocytic leukemia 1 protein), TCF3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factoring E12-/E47) and LDB1 (LIM domain-binding protein 1) to form a protein complex that activates the transcription of erythroid target genes (Wadman et al., 1997). In this complex, Tal-1 is essential for erythroid and megakaryocytic developments (Wen et al., 2011). The post-translational modification of GATA-1 is reportedly important for its transcriptional activity. Immunoprecipitation experiments on the nuclear extracts of erythroid cells showed that GATA-1 can interact with CREB-binding protein (CBP)/p300 (Blobel et al., 1998). The p300 protein exerts associated acetyltransferase activity and acetylates GATA-1, required for DNA binding and transcriptional activation. The other member of the GATA family of proteins, GATA-2, cooperates with GATA-1 in a dynamic model of hematopoiesis control (Ferreira et al., 2005). At the early stages of erythroid differentiation, GATA-2 can activate the transcription of the GATA-1 gene, while GATA-1 expression represses the GATA-2 gene during development (Bresnick et al., 2010; Ikonomi et al., 2000a,b). Interestingly, GATA-1 and GATA-2 regulate their own gene expression. GATA-2 overexpression results in the megakaryocytic differentiation of cells to the detrimental erythroid lineage and is expressed in mast cells, and megakaryocytes, as well as non-hematopoietic embryonic stem cells. In addition to its role in regulating differentiation pathways, GATA-2 is expressed early in HSCs, where it plays an important role in the activation of cell proliferation.

The E26 transformation-specific (ETS) transcription factor PU.1/SP1 is a key hematopoietic regulator that plays a specific role in myeloid and lymphoid differentiation. The expression level of PU.1 varies dynamically during hematopoiesis to guide the HSCs to one or the other hematopoietic differentiation pathway. PU.1 is overexpressed in B-cells and macrophages, whereas it is expressed at lower levels in mature erythroid cells, megakaryocytes and T cells. The inappropriate expression of PU.1 in hematopoietic-specific cells may lead to leukemic transformation, as is the case in T-cell lymphomas or erythroleukemia (Moreau-Gachelin et al., 1996; Rosenbauer et al., 2004). Studies have shown that GATA-1 and PU.1 can physically interact and inhibit each other via the N-terminal and C-terminal part of PU.1 and the C-terminal region of GATA-1. The N-terminal region of PU.1, but not the C-terminal one, is required to specifically block the binding of GATA-1 to DNA (Zhang et al., 2000). Thus, the differential activities of transcription factors can determine the commitment of cells in a specific differentiation pathway. Fli-1 and GA binding protein (BP)- $\alpha$ , which both belong to the ETS family of transcription factors, likely play a role in the fate of the differentiation of megakaryo-erythroid progenitors. Fli-1 is a positive regulator of megakaryopoiesis (Hart et al., 2000), whereas it negatively regulates erythroid differentiation (Athanasiou et al., 2000). GABP- $\alpha$  is a specific regulator of genes expressed during the early stages of megakaryopoiesis. It regulates the expression of the integrin  $\alpha$ IIb/ $\beta$ 3 and the CD110/c-Mpl genes (Pang et al., 2006). The ratio GABP- $\alpha$ /Fli-1 decreases during maturation, and this decrease correlates well with the regulation of the expression of early genes by GABP- $\alpha$  and late genes by Fli-1. Ets-1 is overexpressed during megakaryocyte development. Its overexpression in CD34<sup>+</sup>/HSCs results in the megakaryocytic differentiation to the detrimental erythropoiesis lineage (Dore et al., 2012).

The proto-oncogene c-Myb is an essential regulator of hematopoiesis and affects the growth, survival, proliferation and differentiation of hematopoietic cells. C-Myb plays a critical role in the commitment of stem cells to the erythroid or megakaryocytic pathway, and its interaction with GATA-1 ensures proper megakaryocytic differentiation. C-Myb factor also influences the progenitors in this differentiation pathway, but in contrast to GATA-1, c-Myb does not affect terminal differentiation (Garcia et al., 2011). Its expression is elevated in colony forming units-erythroid (CFU-E) and erythroblasts. In erythroleukemia cells that are blocked at the CFU-E stage,

c-Myb can act as an inhibitor of terminal erythroid differentiation (Vegiopoulos et al., 2006).

The versatile activity of transcription factors described here reflects the complexity of the regulatory network, including further transcription factors and cofactors, miRNAs and lncRNAs, that manages hematopoietic cell differentiation and proliferation programs. The disruption of a connection in this network can lead to the deregulation of hematopoiesis and lead to hematological disease, including leukemia.

In addition to pharmaceuticals, a wide variety of plant-derived compounds (phytochemicals) can modify cell differentiation by targeting specific steps of the regulatory network. The aim of this review was to identify phytochemicals and pharmaceuticals that can induce leukemia cell differentiation. During the last two decades, various, structurally unrelated natural compounds have been investigated as differentiating agents, particularly those that act on different hematopoietic pathways as well as osteogenesis. We focused on compounds that reportedly induce the differentiation of blasts from myeloid leukemia as well as multiple myeloma (MM)-related osteogenesis (Fig. 1) because differentiation arrest is a critical feature of these cells.

## 2. Induction of myeloid differentiation in acute myeloid leukemia cells

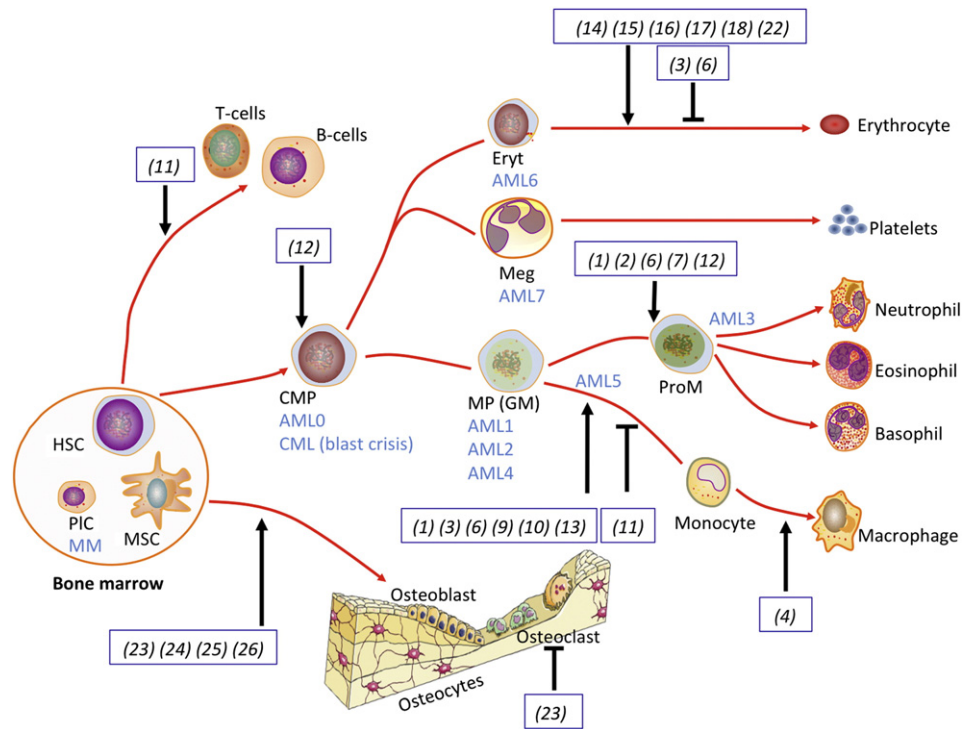
### 2.1. Acute myeloid leukemia features

Acute myeloid leukemia (AML) mainly results from chromosomal translocations that produce fusion proteins with aberrant activities, which leads to the deregulation of the cell cycle and failure of hematopoietic differentiation. Clinically, the disease is associated with hyperleukocytosis, extramedullary disease and abnormal coagulation. AML is characterized by concentrations of highly proliferative myeloblastic cells in the blood or bone marrow that exceed 20%. Neoplastic cells replace normal hematopoietic stem cells, leading to a decrease in the number of blood cells as well as anemia, thrombocytopenia and neutropenia.

Several chromosomal translocations have been clearly identified as the main cause of AML leukemogenesis. The most frequent translocation t(8;21)(q22;q22) gives rise to the Runt-related transcription factor 1/Eight Twenty-One (RUNX1/ETO) (a.k.a. AML1-RUNX1T1) fusion gene. This translocation characterizes AML-M2 with potential granulocytic maturation. The AML-M3 that corresponds to acute promyelocytic leukemia (APL) is characterized by the t(15;17)(q22;q12) translocation, which generates the promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor- $\alpha$  (PML/RAR $\alpha$ ) fusion gene. Further chromosomal translocations that result in acute myelomonocytic leukemia (AML-M4), acute monocytic leukemia (AML-M5) and megakaryoblastic leukemia (AML-M7) have been described in AML cells. In addition to chromosomal translocations, point-mutations in the GTPases KRAS and NRAS (Neubauer et al., 1994) as well as in the receptors tyrosine kinase FLT3 and c-Kit in AML cells have been reported (Cairolì et al., 2006; Care et al., 2003). Moreover, transcription factors, including CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) $\alpha$ , RUNX1 and E proteins (Gentleman et al., 2004; Koschmieder et al., 2009; Tang et al., 2009; Wouters et al., 2009), and the epigenetic regulatory proteins HDACs, CBP/p300, PRMT1 and SON are reportedly involved in the initiation/progression of t(8;21) AML-M2 (Gelmetti et al., 1998; Shia et al., 2012).

### 2.2. Acute myeloid leukemia cells differentiation

The anti-cancer activities of the active form of vitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D3 (VD3) (1), have long been linked to the ability of this compound to induce the differentiation of human myeloid



**Fig. 1.** Induction of leukemia cell differentiation by natural compounds and pharmaceuticals. AML, CML and MM affect the differentiation of hematopoietic cells and osteoblasts. Numerous compounds have been reported to be able of inducing leukemia cell differentiation, which leads to cell growth arrest and/or apoptosis. Some molecules also induce osteoblast differentiation. The boxed numbers correspond to molecules as numbered in the text and structure schemes. Associated arrows and sticks indicate the inducing or the inhibiting effect on differentiation, respectively. HSC: hematopoietic stem cell, MSC: mesenchymal stem cell, AML: acute myeloid leukemia, CML: chronic myeloid leukemia, MM: multiple myeloma, PIC: plasma cells, CMP: common myeloid progenitor, MP (GM): myeloid precursor (granulocyte-monocyte), Meg: megakaryoblast, Eryt: erythroblast, and ProM: promyelocyte. Figures were realized in part with ScienceSlides software.

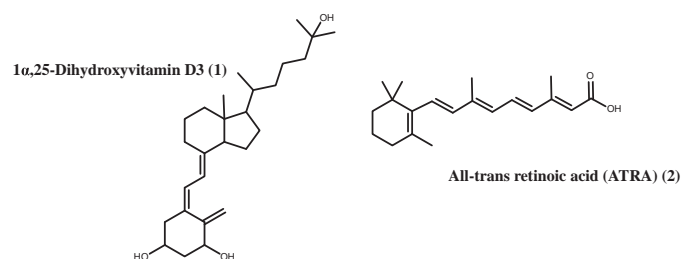
leukemia cells into monocyte–macrophages (Brown et al., 1999; Okamoto et al., 2008), including in pro-myelocytic HL60, mouse myeloblastic leukemia M1 and histiocytic monoblast-like lymphoma U937 cells (Abe et al., 1981; Tanaka et al., 1983). VD3 (1) activates several signaling pathways, such as the MAPK and PI3K/AKT pathways, as well as lipid signaling pathways (Marchwicka et al., 2014). Moreover, VD3 (1) acts by binding to the specific nuclear Vitamin D3 receptor (VDR), which heterodimerizes with Retinoid-X-Receptor (RXR) to express genes that are involved in differentiation and cell cycle regulation. VD3 (1) also induces cell differentiation via the transient and sustained up-regulation of the myeloid-related transcription factors C/EBP $\alpha$  and C/EBP $\beta$ , respectively (Marcinkowska et al., 2006). Recently, the ASAP2 (Arf-GAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 2) gene was identified as a primary target of VD3 (1). ASAP2 protein, which is involved in the modulation of phagocytosis and autophagy mechanisms, was induced in VD3-treated monocytic THP-1 cells in correlation with macrophage differentiation.

Nevertheless, the most efficient differentiation inducer in acute promyelocytic leukemia (APL) therapy has been all-trans retinoic acid (ATRA) (2) (Petrie et al., 2009). In the nucleus, ATRA is the physiological ligand of RAR that is dimerizing with RXR. ATRA interaction with RAR triggers changes in the receptor conformation, leading to the release of the RAR co-repressor complex to the benefit of its interaction with co-activator complex (Johnson and Redner, 2015; Nagy et al., 1999). This allows the RAR/RXR dimer to transactivate target gene transcription. In APL cells, the oncoprotein PML–RAR $\alpha$ , an abnormal transcription factor, acts as a homodimer by blocking the transcription of retinoic acid-regulated genes. PML–RAR is a competitor of RAR for the binding to target promoters by

sequestering RXR, acting as a dominant-negative for RAR signaling. In the PML–RAR $\alpha$  complex, the RAR $\alpha$  moiety binds the DNA of target genes. Due to its conformation, the complex tightly associates with co-repressors, resulting in transcriptional repression and in differentiation arrest. Recently, a systems biology model suggested that PML–RAR $\alpha$  is associated with Retinoid X Receptor (RXR) (Abblain and de The, 2011). PML–RAR $\alpha$  was shown to activate the c-kit promoter gene (Zheng et al., 2009) and to act by modulating myeloid-related transcription factors. It prevents C/EBP $\alpha$  from binding to DNA and suppresses the expression of the myeloid master regulator PU.1. The roles of C/EBP $\alpha$  and PU.1 illustrate the complexity of hematopoiesis regulation. Indeed, C/EBP $\alpha$  plays a role in the early stages of myeloid differentiation, but activates granulopoiesis while inhibiting monopoiesis (Friedman et al., 2003). C/EBP $\alpha$  also reportedly inhibits the activity of PU.1 by preventing its interaction with c-Jun (Reddy et al., 2002). In addition, the C/EBP $\alpha$  promoter is highly methylated in AML cells, which triggers its down-regulation (Musialik et al., 2014). The conformation of PML–RAR $\alpha$  is modified in the presence of retinoic acid, which permits the substitution of co-repressors by co-activators to lead to the transcription of target genes and cell differentiation. ATRA (2) ultimately induces the degradation of PML–RAR $\alpha$  by the proteasome (Yoshida et al., 1996). Conversely, the ATRA-induced granulocytic differentiation of the APL cell lines HL60, NB4 and HT93 as well as primary APL cells correlated with the mRNA expression of the phospholipid scramblase 1 (PLSCR1/MmTRA1b). PLSCR1 is a type II transmembrane protein that facilitates the calcium-dependent bidirectional movement of membrane phospholipids but might also have a nuclear function (Zhang et al., 2008a). Moreover, it is known as a substrate for c-Abl, c-Src, and the protein kinase C $\delta$

(PKC $\delta$ ) (Sahu et al., 2007) and was suspected to play roles in hematopoiesis and leukemogenesis, especially in PLSCR1<sup>-/-</sup> bone marrow cells (Zhou et al., 2002). PLSCR1 has been shown to activate p21waf1/cip1 gene transcription and inhibit c-Myc mRNA and protein expression (Huang et al., 2006). Exogenously expressed antisense PLSCR1 mRNA suppressed the ATRA-induced differentiation of NB4 cells, while sense mRNAs enhanced differentiation; this finding demonstrated that PLSCR1 plays a role in the ATRA-induced granulocytic differentiation of leukemia promyelocytes (Nakamaki et al., 2002). The co-treatment of the NB4 cell line with ATRA (2) and the HDAC inhibitor valproic acid (VPA) (3), a valeric acid (from *Valeriana officinalis* L.) derivative, has recently been investigated. The results revealed that VPA (3) alone could induce the differentiation of NB4 cells and that the combination with ATRA (2) increased the differentiating effect of both drugs as well as cell growth inhibition. The improvement of myeloid differentiation correlated with the up-regulation of CEBP- $\alpha$ , - $\beta$ , and - $\epsilon$ , as well as PU.1 transcription factors (Iriyama et al., 2014). This finding suggested that VPA (3), which is a well-known therapeutic agent, might be effective for APL treatment in a combinational therapeutic approach with ATRA (2). Moreover, VPA (3) was shown to induce the differentiation of cell lines derived from neuroblastoma (Blaheta and Cinatl, 2002).

Such differentiating inducers of cancer cells remain rare. Naturally occurring molecules have been shown to exert differentiating activities on myeloid leukemia cells, in most cases by enhancing the effect of ATRA (2).



Securinine (4), an alkaloid from the root of the plant *Flueggea suffruticosa* (Pall.) Baill., is a potential myeloid leukemia differentiation-inducing agent. This compound has been used as a  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA) receptor antagonist in the treatment of primarily neurologically related diseases, including amyotrophic lateral sclerosis, multiple sclerosis and poliomyelitis (Beutler et al., 1985). Moreover, securinine (4) was shown to induce apoptosis in p53-deficient colon cancer cells (Rana et al., 2010) and was recommended as a potential therapeutic agent against infectious processes, as it induces macrophage activation (Lubick et al., 2007). Interestingly, securinine (4) was also reported to induce monocytic differentiation via the up-regulation of CD11b and CD14 in HL60 cells and NBT reduction in HL60, OCI-AML3 and THP-1 cells, which all differentiate towards monocytes. The down-regulation of c-Myc and c-Myb as well as the up-regulation of CEBP- $\beta$  and potentially the CEBP- $\delta$ , egr-1, mafB, c-fos and c-jun transcription factors validated the differentiating activity of securinine (4) in AML cell lines and primary leukemic patient samples. Studies of the molecular mechanisms in OCI-AML3 cells showed that securinine induced terminal differentiation by reducing DNA damage. This action correlated with the modulation of histone H2AX and Chk1 phosphorylation as well as the induction of p53 and p21, which are associated with growth arrest and AML differentiation (Gupta et al., 2011). Furthermore, the ability of securinine (4) to trigger growth arrest in cell lines, patient samples and AML tumors in nude mice confirmed its clinical potential as a therapeutic agent for AML treatment (Gupta, Chakrabarti, 2011). Securinine (4) was also shown to enhance the differentiating activities of ATRA (2), cytidine analog 5-aza-2'-deoxycytidine (5) (decitabine or dacogen) and VD3 (1) on HL60 cells,

suggesting that this natural alkaloid could also be used in a combination therapy.

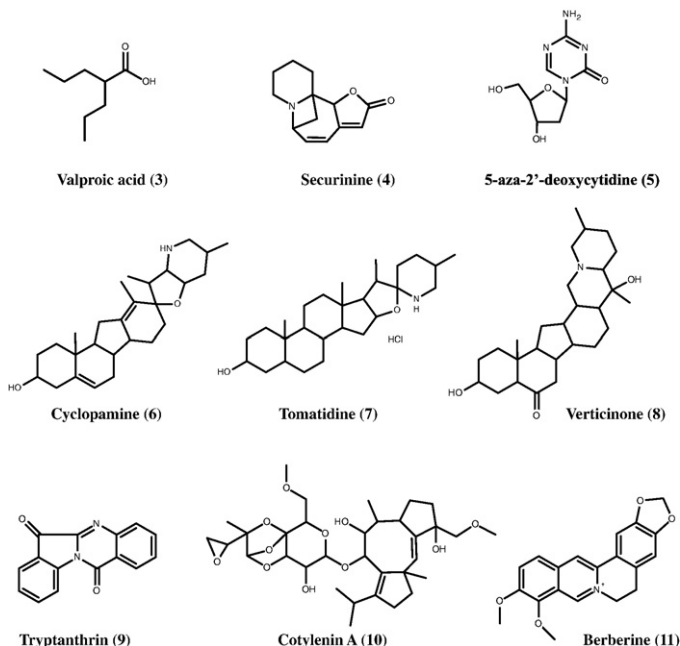
Similarly, plant-derived steroidal jerveratrum alkaloid cyclopamine (6) from the corn lily *Veratrum californicum* Durand was shown to enhance HL60 cells differentiation in association with ATRA (2). This enhancement correlated with the up-regulation of T cell marker CD44. A similar differentiating effect was observed in primary cells from patients, with increased CD44 expression as well as an induction of the myeloid markers CD11b, CD14 and CD15. Conversely, cyclopamine (6) inhibits the hedgehog signaling pathway. Hedgehog family members are secreted glycoproteins that control embryonic cell development and the maintenance and regeneration of adult tissues by regulating adult stem cells. A dysfunctional hedgehog pathway has also been implicated in the development of cancer. Tomatidine (7), which is similar to cyclopamine (6) but cannot inhibit the hedgehog pathway, efficiently enhanced the ATRA-induced myeloid differentiation of AML cells, suggesting that cyclopamine (6) promotes differentiation independently of hedgehog signaling inhibition. In addition to its effects on leukemia cell differentiation, cyclopamine (6) was shown to inhibit proliferation and induce apoptosis in several malignancies in vitro and in vivo (Takahashi et al., 2011). However, Detmer et al. demonstrated that cyclopamine (6) could inhibit the erythropoiesis of normal bone marrow mononuclear cells, suggesting that the hedgehog signaling pathway is involved in erythroid development (Detmer et al., 2000).

The isosteroidal alkaloid verticinone (8) from the bulbs of *Fritillaria usuriensis* Maxim has been used in traditional Chinese medicine for its antitussive, expectorant, analgesic and antitumor effects (Wu et al., 2010). Nevertheless, the bioactivity of verticinone (8) is low and it is cytotoxic. At lower concentrations, verticinone (8) was shown to inhibit the growth of myeloblastic leukemia HL60 cells without cytotoxic effects. Interestingly, this effect correlated with the induction of the granulocyte differentiation of HL60 cells, as evidenced by CD11b up-regulation and an unchanged expression of the monocyte/macrophage marker CD14. The mechanism of action underlying the differentiating activity of verticinone remains unknown, but co-treatment experiments with ATRA (2) revealed that verticinone (8) increased the differentiating activity of ATRA (2) in a dose-dependent manner. Given the severe side effects of ATRA (2) (retinoic acid syndrome), verticinone (8) could be useful in therapy conjunction with ATRA (2) (Pae et al., 2002).

Alternatively, some natural molecules were shown to be able to induce myeloid differentiation independently of ATRA (2), including the alkaloid tryptanthrin (6,12-dihydro-6,12-dioxindolo-(2,1-b)-quinazoline) (9), the diterpenoid cotylenin A (10) and the isoquinoline alkaloid berberine (11). Tryptanthrin (9) is isolated from the dried roots of the medicinal indigo plants *Isatis tinctoria* L. or *Isatis indigotica* (Ban-Lan-Gen) and displays anti-microbial, anti-inflammatory, immunomodulatory and anti-tumor effects. Chan et al. suggested that tryptanthrin (9) might exert its anti-tumor effect by triggering cell cycle arrest and cell differentiation (Chan et al., 2009). They showed that tryptanthrin (9) suppressed the proliferation of murine myelomonocytic leukemia WEHI-3B JCS cells in vitro by down-regulating the expression of the cyclin D2, D3, cyclin dependent kinase (CDK) 2, 4 and 6 genes. Interestingly, the growth of WEHI-3B JCS cells was also decreased in vivo when transplanted into syngeneic BALB/c mice. Moreover, tryptanthrin (9) induced the differentiation of WEHI-3B JCS cells, as evidenced by an increase in vacuolation, cellular granularity and NBT-reducing activity in tryptanthrin-treated cells. Cotylenin A (10), a plant growth regulator with cytokinin-like activity, displayed differentiating activities in human and murine ATRA-resistant myeloid leukemia cell lines as well as in cells isolated from acute myeloid leukemia (AML) patients, and this effect was more potent than those of ATRA (2) and VD3 (4) (Honma et al., 1989, 1990). The mechanism of action of cotylenin A (10) as a differentiating agent involves a receptor of fusococcin, a member of the 14-3-3 family of proteins that is involved

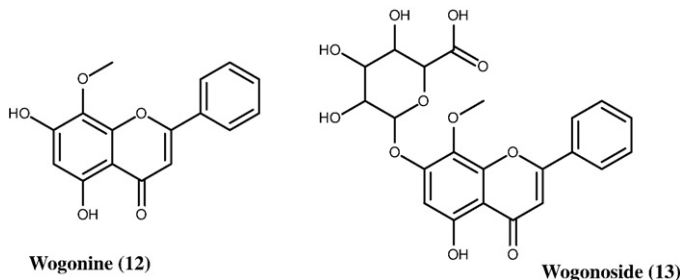


in the signal transduction pathway triggered by the transforming growth factor (TGF)- $\beta$ . The isoquinoline alkaloid berberine (11), which is usually found in the roots, rhizomes, stems, and bark of the plant *Berberis vulgaris* L., was shown to be cytotoxic to murine leukemia WEHI-3 cells in vitro and in vivo in a dose-dependent manner and inhibited leukemia-related spleen growth in mice. Interestingly, berberine (11) increased the number of peripheral monocytes and granulocytes with immature morphology while reducing the expression of the markers Mac-3 and CD11b, which indicates that the differentiation of macrophage and granulocyte precursors was inhibited. In contrast, it did not affect the expression of the markers CD14 (macrophages and neutrophils) and CD3 markers (T-cells), but increased the expression of the marker CD19, indicating the promotion of B-cell precursor differentiation in mice (Chen et al., 2007).



The natural flavonoid wogonine (5,7-dihydroxy-8-methoxyflavone) (12) derived from the Chinese herb *Scutellaria baicalensis* Georgi has been reported to induce the differentiation of AML cells independently of ATRA (Zhang, Guo, 2008a). Wogonine (12) exerts antioxidant, anti-inflammatory, antiviral and neuroprotective effects (Huang et al., 2012; Lim, 2003; Tai et al., 2005; Wang et al., 2006a,b). Moreover, wogonine (12) is characterized by a wide spectrum of antitumor properties, as demonstrated in various cancer cells (Ikemoto et al., 2000). These properties include the induction of cell cycle arrest, apoptosis and differentiation, inhibition of angiogenesis and invasion, and sensitization to apoptosis. These effects were particularly evident in hematologic malignancies (Baumann et al., 2008). As demonstrated by a NBT reduction test, cell morphology analysis by Giemsa staining and the expression of CD11b and CD14, wogonine (12) induced the differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line NB4 via the t(15;17) chromosomal translocation expressing PML-RAR $\alpha$  fusion protein. Interestingly, the induction of differentiation was concomitant to an increase in PLSCR1 expression as well as the phosphorylated form of PKC $\delta$  (Zhang, Guo, 2008a). Furthermore, ATRA (2), 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), and VD3 (1) could induce the histiocytic lymphoma U937 cell line to differentiate into a monocyte/macrophage lineage (Tabé et al., 2004). Wogonine (12) induced similar changes in the morphological features of U937 cells, demonstrating its ability to induce the myeloid differentiation of U937 cells. Unlike the response to ATRA (2), the expression of CD11b was significantly increased, while that of CD14 was not changed. This finding suggested that wogonine (12) induced the granulocyte-like

differentiation of U937 cells, as evidenced by the CD11b<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup> ratio. In accordance with cell differentiation, wogonine (12) induced cell cycle arrest in correlation with a phospho-PKC $\delta$ -dependent increase in the expression levels of Rb and p21 and a decrease in the expression of cyclin D1/CDK4. The flavonoid wogonoside (13), a metabolite of wogonine (12), also displays anti-inflammatory (Lim, 2003) and anti-inflammation-induced angiogenic activities (Chen et al., 2009). Wogonoside (13) was recently shown to exert anti-proliferative effects on human AML cells in vitro and in vivo. This effect correlated with the down-regulation of the CDK4 and cyclin D1 protein levels as well as an increase in the level of CDK4 inhibitor p16 protein in U937 and HL60 cells. Interestingly, wogonoside (13) induced the monocytic differentiation of both cell lines, as evidenced by the increased expression of CD11b and CD14. Moreover, PLSCR1 expression was up-regulated via the transcriptional activation of the gene, and transfection with PLSCR1 siRNA partially inhibited wogonoside-mediated cell cycle arrest and differentiation induction, proving its involvement in these phenomena. The expression of p21waf1/cip1 was increased in wogonoside-treated U937 and HL60 cells, while that of c-Myc was inhibited; these changes agreed with PLSCR1 up-regulation as well as the effect on the cell cycle and monocytic differentiation (Chen et al., 2013). In addition to its ability to differentiate AML cells, wogonine (12) was also shown exert effects on CML cells.



### 3. Induction of chronic myeloid leukemia cell differentiation

#### 3.1. Chronic myeloid leukemia

Chronic myeloid leukemia is a clonal disorder of pluripotent hematopoietic stem cells characterized by an abnormal accumulation of immature leukemic blast cells in the blood, bone marrow and spleen and the blockade of the terminal differentiation of myeloid cells. Notably, leukemic cells in the blast crisis (BC) are characterized by a significant decrease in differentiation capacity. This phase of the disease features the highest number of blasts in white blood cell population and bone marrow. BC is preceded by the chronic phase, which is usually asymptomatic and characterized by an increase in mature granulocytes, followed by an accelerated phase of the disease. Myeloid cells then proliferate, whereas the number of erythroid cells decreases to result in anemia, which is commonly observed in CML patients.

Chronic myeloid leukemia results from the chromosomal translocation t(9;22)(q34;11) between the breakpoint cluster region (BCR) and the Abelson (ABL) genes, which are also known as the Philadelphia chromosome. The resulting fusion gene, BCR-ABL, gives rise to the protein Bcr-Abl, which displays constitutive tyrosine kinase activity. The kinase c-Abl is usually located in the nucleus and translocates to the cytoplasm upon activation, whereas Bcr-Abl is only found in the cytoplasm. Two main forms of the Bcr-Abl protein can be generated depending on the location of the breakpoint on chromosome 22. The 210-kDa protein (p210) is associated with CML as well as acute lymphoblastic leukemia (ALL) (Advani and Pendergast, 2002), while the 190-kDa (p190) protein is found only in ALL (Heisterkamp and Groffen, 1991; Kurzrock et al., 1988;

Sawyers et al., 1991). A more atypical form of Bcr–Abl, p230, has been identified in CML patients with mature neutrophils (Pane et al., 1996).

The tyrosine kinase Bcr–Abl activates numerous signaling pathways, including PI3K/AKT, Ras/Raf/Mek/Erk, and the Janus Kinase (JAK)/Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) pathways, and this activation is independent of physiological signaling cascades that are normally generated by the interaction of cytokines with their receptors (Goldman and Melo, 2003; Mandanas et al., 1993; Reuther et al., 1998; Sawyers et al., 1995; Skorski et al., 1997). While cytokines regulate cell proliferation and survival in correlation with correct hematopoietic development, the constitutive activity of Bcr–Abl leads to cell proliferation and apoptosis inhibition in CML cells. In the normal case, the activation of the JAK/STAT pathway is triggered when hematopoietin and interferon are linked to their specific receptors coupled to JAK proteins. In CML cells, the Bcr–Abl-mediated activation of STAT factors does not depend on the JAK activity, but the mechanism of this activation could be similar to that of the Src-mediated activation of STAT. The Src-homology (SH)2 and SH3 domains in Bcr–Abl constitutively activate the STAT factors (Chaturvedi et al., 1997; Ilaria and Van Etten, 1996). STAT5 activation is particularly involved in CML cell growth and viability (Sillaber et al., 2000). Notably, the target genes of STAT5, including the oncogene c-Myc, are activated in Bcr–Abl-expressing cells, leading to the activation or repression of several gene transcription, such as CDK and the anti-apoptotic protein Mcl-1. Conversely, the oncoprotein Ras plays a key role in CML pathogenesis and triggers the proliferation of myeloid cells (Baum and Ren, 2008). However, its effect on erythropoiesis is not clear. A dominant negative mutant of Ras, N17 H-Ras, was used to demonstrate that Ras activation is required for the development of lymphoid and erythroid cells (Baum and Ren, 2008). Darley et al. reported that Ras conferred developmental abnormalities on human erythroid cells via the activation of PKC and its target p21<sup>CIP1/WAF1</sup> (Darley et al., 2002). Furthermore, the inhibition of Ras with the farnesyltransferase inhibitor manumycin A increased the erythroid colony formation of CML cells. In agreement with this observation, the authors showed that GATA-1 interacts with MEK in primary erythroid progenitors to contribute to the blockage of Ras signaling. Interestingly, STAT5 and PI3K did not suppress erythropoiesis from murine LSK cells (Tokunaga et al., 2010).

In addition to the Bcr–Abl fusion gene, various other events have been associated with CML progression, such as the gain-of-function mutation of GATA-2 (Zhang et al., 2008b) and mutations in the tumor suppressor genes p53 and Rb (Di Bacco et al., 2000). Conversely, Bcr–Abl also mediates the decreased expression of C/EBP $\alpha$  to trigger the blockade of CML cell myeloid differentiation.

The treatment of CML directly targets Bcr–Abl by inhibiting its tyrosine kinase activity. Gleevec®, which is also called STI-571 or imatinib, is a synthetic compound that was approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) in 2001 as a first-line treatment for Philadelphia chromosome-positive CML. Crystallographic data showed that imatinib specifically interacted with the ATP binding site of Bcr–Abl to inhibit its kinase activity (Hantschel and Superti-Furga, 2004; Nagar et al., 2003). The inhibition of Bcr–Abl activity was shown to downregulate the STAT5-dependent anti-apoptotic gene Bcl-X<sub>L</sub>, leading to apoptosis of CML cells (Horita et al., 2000). Additional kinases inhibitors with different mechanisms of action, including nilotinib, dasatinib, bosutinib, and ponatinib, have been generated due to the development of imatinib resistance. Moreover, many synthetic and natural compounds have been described as JAK2/STAT3/5 pathway inhibitors, which could potentially reduce the activity of Bcr–Abl-activated signaling pathways (Trecul et al., 2012). Interestingly, STAT5 and PI3K did not suppress the erythropoiesis of murine LSK cells (Tokunaga, Ezoë, 2010). In addition to Bcr–Abl-mediated signaling pathways and the tyrosine

kinase activity of the oncoprotein, the heat-shock protein (HSP)90 constitutes a potential target in CML cells. Indeed, Bcr–Abl is protected from proteasomal degradation by its interaction with HSP90, whose inhibition leads to Bcr–Abl degradation (Whitesell and Lindquist, 2005).

### 3.2. Induction of CML cell erythroid differentiation

The induction of differentiation of CML cells in blast crisis, which characterizes the terminal phase of the disease, was demonstrated as conceivable several decades ago using the K562 cell line. The anthracyclines and antibiotics aclacinomycin A from *Streptomyces galilaeus* (14) and doxorubicin (15) from *Streptomyces peucetius* were shown to induce the erythroid differentiation of K562 cells by promoting the expression of erythroid-specific genes. Aclacinomycin (14) exerts its differentiating activity by up-regulating the key transcription factors GATA-1 and nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2), while doxorubicin (15) induced the hemoglobinization of K562 cells by increasing the half-life of  $\gamma$ -globin mRNA (Jeannesson et al., 1997; Morceau, Aries, 1996a; Morceau et al., 1996b; Trentesaux, Nyoung, 1993). Similarly, the nucleotide guanosine triphosphate (GTP) (16) induced erythroid differentiation via a transient increase in GATA-1 expression together with the stabilization of the  $\gamma$ -globin mRNA, which involved its 3'-untranslated region (Morceau et al., 2000; Osti et al., 1997). Interestingly, the appearance of differentiation features was accompanied by a cytostatic effect in all cases.

The benzophenanthridine alkaloid fagaronine (17) from the plant *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepern. & Timler, was shown to display anti-leukemic activity against the murine leukemia cell line P388 in vivo. This drug also inhibited DNA polymerase activity in murine embryos as well as nucleic acid and protein synthesis in the human cervical carcinoma KB cells. Similarly to anthracyclins, the anti-tumoral activities of the fagaronine (17) are related to its ability to intercalate DNA. Moreover, fagaronine (17) interacts with the ribosomal system and inhibits the activities of the DNA topoisomerases I and II, human DNA ligase I and reverse transcriptase from RNA viruses. Conversely, fagaronine (17) was shown to strongly induce the erythroid differentiation of K562 cells (Dupont et al., 2005). The induction of hemoglobin production was shown to be concomitant to GATA-1 and NF-E2 mRNAs up-regulation. These results correlated with a strong increase in the expression levels of the EpoR, globins ( $\alpha$  and  $\gamma$ ) and porphobilinogen deaminase (PBGD), which indicated that the erythroid differentiation program was activated. The role of GATA-1 as a fagaronine-induced activator of erythroid gene transcription was validated by transfection cells with luciferase reporter constructs under the control of Epo-R,  $\gamma$ -globin and GATA-1 gene promoters with wild type or mutated GATA-binding sequences.

Wogonine (12) was previously shown to mediate AML cell myeloid differentiation. It was also recently reported to induce erythroid features in CML K562 cells, as evidenced by the increase in the expression of specific markers, including glycophorin A,  $\gamma$ -globin and CD71, as well as the rate of hemoglobin production by cells. Differentiation was accompanied by a cell cycle arrest at the G0/G1 phase and a concomitant up-regulation of p21 and down-regulation of CDK4 and cyclin D1. In addition, the Bcr–Abl-mediated phosphorylation of MEK and ERK in K562 cells was inhibited by wogonine (12). Differentiation and cell cycle arrest were related to an increase in the expression of the key erythroid transcription factor GATA-1 and its interaction with its cofactor FOG-1. Interestingly, wogonine (12) exerted similar effects on imatinib-resistant K562 cells. Its effect on Bcr–Abl was not demonstrated, but this finding nonetheless suggests that its mechanism of action is dissimilar to that of imatinib. Moreover, wogonine (12) induced the differentiation and proliferation arrest of primary CML cells from patients via mechanisms to those in K562 cells (Yang et al., 2014). In erythroleukemia cells, transcriptional and post-transcriptional processes were often described as playing a crucial role in the effect of

differentiating agents, especially involving GATA-1. The induction of erythroid differentiation was accompanied by cell growth arrest.

The inhibition of HSP90 expression also induced erythroid differentiation in K562 cells. The nonaketide compound radicicol (18), which is isolated from *Monocillium nordinii*, was reported to trigger Bcr–Abl fusion oncoprotein degradation (Burger et al., 1994) by inhibiting the activity of chaperone protein HSP90 (Schulte et al., 1998). HSP90 blockade and Bcr–Abl inactivation correlated with the reactivation of the erythroid program in K562 cells. Radicicol (18) down-regulated the transcription factor PU.1, an inhibitor of erythropoiesis, while the transcriptional activity of GATA-1 was increased. In addition, the GATA-1 cofactors FOG-1 and SP1 were over-expressed (Morceau et al., 2008). As a suitable natural substance to study HSP90 involvement in cancer cells, radicicol (18) paved the way for the development of HSP90 inhibitors that are more stable in vivo. Geldanamycin (19), a benzoquinone ansamycin antibiotic from *Streptomyces hygroscopicus*, and its analog tanespimycin (17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, 17-AAG) (20) (Powers and Workman, 2006; Schnur et al., 1995; Supko et al., 1995) as well as ganetespib (21) were subsequently developed for cancer therapy (Athanasidou, Mavrothalassitis, 2000).

Apigenin (22), which can be found in dandelion coffee (Tsolmon et al., 2011), was shown to specifically induce the erythroid differentiation of K562 cells while down-regulating the expression of granulocyte (CD11b), monocyte (CD14) and megakaryocyte (CD41a) markers, which are normally expressed in this cell line. Apigenin (22) clearly induced the mRNA expression of the erythroid transcription factors GATA-1 and GPA, which indicated that K562 cells were differentiating into the erythroid lineage. A proteomic analysis showed that the expression of genes involved in erythroid differentiation was induced, including elongation factor Tu, multifunctional protein ADE2, peptidyl-prolyl cis–trans isomerase A (PPIase A), hemoglobin  $\gamma$ , RNA-binding protein (RBP)1 and 14-3-3 $\zeta/\delta$  proteins.

Hatano et al. reported that water-soluble extracts from *Angelica acutiloba* (Siebold & Zucc.) kitag., contain polysaccharides that can activate immature erythroid cells, in part by suppressing cytokine secretions due to a malignancy or chemotherapy. This treatment significantly lowered the plasma interferon (IFN)- $\gamma$  levels, which may suppress the activity of erythroid progenitor cells. Indeed, the water-soluble fraction that contains polysaccharides activated erythroid progenitor cells in the bone marrow and increased the percentage of peripheral reticulocytes in red blood cells in an animal model of anemia as evidenced by a bolus injection of 5-fluorouracil (5FU) (Hatano et al., 2004). These results are not surprising since pro-inflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  and IL6) are known to disturb hematopoiesis, especially erythropoiesis. Indeed, anemia is frequently diagnosed in chronic inflammatory diseases and cancer patients (Morceau et al., 2009). IFN- $\alpha$ , - $\beta$  and - $\gamma$  were shown to up-regulate PU.1 in K562 cells (Gutierrez et al., 1997), while IFN- $\gamma$  was later reported to inhibit erythropoiesis via the activation of the interferon regulatory factor (IRF)-1, which positively regulates PU.1 gene expression; these changes were shown to lead to anemia (Libregts et al., 2011). Similarly, TNF $\alpha$ , which is one of the main cytokines implicated in cancer-related anemia, was shown to inhibit GATA-1 activity in K562, HEL and TF1 erythroleukemia cells as well as in erythropoietin (Epo)-stimulated CD34<sup>+</sup>/HSCs (Buck et al., 2008, 2009a,b; Grigorakaki et al., 2011; Morceau, Dicato, 2009; Morceau et al., 2006). The TNF $\alpha$ -mediated up-regulation of GATA-2 and PU.1 and the promotion of the GATA-1/PU.1 inhibitory interaction was especially pronounced in HSCs and correlated with erythropoiesis perturbation (Grigorakaki, Morceau, 2011).

#### 4. Multiple myeloma and osteoblastic targets

In multiple myeloma (MM) disease, clonal malignant plasma cells that accumulate in the bone marrow reduce the bone formed by

osteoblasts and stimulate bone destroyed by osteoclasts. While osteoblasts build bone by forming groups of connected cells, osteoclasts are large multinucleated cells that destroy bone. Equilibrium in the function of both cell types is critical for the maintenance and repair of compact skeletal bones. Therefore, in addition to targeting myeloma cells to treat MM patients, osteoclasts and osteoblasts must also be considered as potential targets. The use of drugs that can induce differentiation of osteoblasts has been proposed as a therapeutic alternative to MM treatment. Osteoblast differentiation requires the activities of the Runx2 and Osterix transcription factors as well as growth factors, including the superfamily of bone morphogenetic proteins (BMPs), such as TGF- $\beta$  and the fibroblast growth factors (FGFs).

The polyphenol resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) (23), which is mainly extracted from grapes but also from the roots of the Japanese Knotweed *Reynoutria japonica* Houtt., has been shown to induce osteoblast differentiation and of interest for the treatment of multiple myeloma patients. In addition to its ability to induce apoptosis and inhibit the growth of the myeloma cell lines RPMI 8226 and OPM-2, resveratrol (23) down-regulated the expression of the receptor activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) at both mRNA and cell surface protein expression levels, and this factor stimulates osteoclast differentiation, activation and migration. Furthermore, resveratrol (23) induced the expression of the osteoblast markers osteocalcin and osteopontin in immortalized human bone marrow stromal mesenchymal stem cells (hMSC-TERT) to give rise to osteoblasts. Resveratrol (23) exerted a synergistic effect with the VD3 (1) on the expression levels of osteocalcin and osteopontin, and this effect correlated with an up-regulation of VD3 nuclear receptors (Boissy et al., 2005).

The natural compound acerogenin A (24), which is isolated from the maple *Parthenocissus tricuspidata* (Siebold & Zucc.) Planch., was reported to induce osteoblast differentiation. Acerogenin A (24), stimulated the proliferation of the Runx2-deficient MC3T3-E1 and RD-C6 mouse osteoblastic cells and increased the alkaline phosphatase activity, which is necessary for phosphate deposition in bone. In MC3T3-E1 and RD-C6 cells as well as in primary osteoblasts, acerogenin A induced osteoblast differentiation concomitant to increased osteocalcin mRNA expression, a specific marker and component of the organic matrix of bone. The expression levels of the transcription factors Osterix and Runx2 mRNAs were also up-regulated, and this increase was prevented by the BMP specific-antagonist, noggin. Acerogenin A (24) clearly increased the mRNA expression levels of Bmp-2, Bmp-4, and Bmp-7 mRNA in MC3T3-E1 cells (Kihara et al., 2011). Similarly, silibinin (25), an active constituent of the standardized extract silymarin from *Silybum marianum* (L.) Gaertn., enhanced the osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells, likely by inducing BMPs expression and activating the BMP and Runx2 pathways (Ema et al., 2014).

Alternatively, the flavonoid baicalein (5,6,7-trihydroxyflavone) (26), which is isolated from the roots of *S. baicalensis* Georgi, was also shown to induce the differentiation of the mouse osteoblastic line MC3T3-E1. Baicalein (26) induced early osteoblast differentiation by activating the MAP kinase/NF- $\kappa$ B signaling pathway, and this activation correlated with an increase in the expression of osteoblast differentiation markers. In the late stages, baicalein (26) stimulated calcium deposition via the activation of MAP kinases and the transcription factors Fra-1 and Fra-2 (Kim et al., 2008).

#### 5. Discussion and conclusion

Numerous naturally occurring molecules from the plant kingdom have interesting anti-cancer properties, including the ability to induce cell differentiation by targeting different molecular regulatory pathways (Fig. 1). The effects of various compounds on the

differentiation of bone marrow-derived hematopoietic and osteogenic cells have been extensively studied. The differentiation pathways of solid tumors and tissues can also be activated by natural compounds, including adipogenesis (Jelkmann, 2011), chondrogenesis (Hara et al., 2013) and neuronal cells (Lecanu et al., 2012). These molecules represent potential alternatives to support traditional anticancer chemotherapies, especially for leukemia and multiple myeloma treatments, as reported in studies in cell lines as well as in leukemia cells from patients and in animals.

Altogether, natural compounds displaying differentiating activities on leukemia cells from patients and in *in vivo* experiments were obviously first reported as efficient inducers of leukemia cell lines *in vitro*. They were shown to modulate the expression and activities of key regulators and especially transcription factors. Differentiating activities led to the expected inhibition of cell proliferation to support the anticancer effect. Some of them have been more extensively studied and remain promising, while other compounds displaying also interesting *in vitro* results remain explored for several years. Induction of AML cell differentiation was demonstrated by cyclopamine (6), tomatidine (7), verticinone (8), tryptanthrin (9), cotylenin A (10), berberine (11), wogonine (12) and wogonoside (13) alone or in association with ATRA through at least CD11b and CD14 up-regulation. The mechanisms of action of most inducers involve main regulatory factors CEBP, PU.1, PLSCR1 and PKC regulating the myeloid differentiation program. Interestingly the well-known therapeutic agent VPA is a promising APL treatment in combination with ATRA (2) (Iriyama et al., 2014). Moreover, securinine (4) displayed effective differentiating activities in primary leukemic patient samples as well as in AML tumors in nude mice. Accordingly, this alkaloid can be considered as a potential therapeutic agent for AML treatment (Gupta, Chakrabarti, 2011). VPA (3) and securinine (4) present a particular interest for a clinical approach because both molecules have been clinically used as drugs for a long time. Furthermore, the natural flavonoid wogonine (12) and its metabolite wogonoside (13), induce AML cell differentiation independently of ATRA. These extensively investigated molecules provide both very interesting *in vitro* data (Chen, Hui, 2013) and also encouraging *in vivo* investigations. Retinoic acids (RA) trigger severe side effects in patients (Fenaux et al., 2007; Moise et al., 2007) and the development of resistance arises in a variety of cancers after RA-based chemotherapy (Freemantle et al., 2003). Therefore it becomes necessary to develop new RAR ligands with a novel drug design strategy different from retinoids, to improve efficiency and significantly lower adverse effects. However, only a few natural RAR ligands have been identified. The diterpenes pimaradienoic acid, abietic acid and pimaric acid display a different structure compared to RA while they were reported as novel natural specific RAR agonists and capable of activating RAR signaling. Interestingly, the three compounds induced HL60 cell differentiation as shown by a NBT assay, turning these molecules into potential inducing agents (Tanabe et al., 2014). The marine terpenoid luffariellolide isolated from *Acanthodendrilla* sp. was reported as a natural and specific RAR agonist since it does not bind to RXR. The carboxylic acid of retinoids is substituted by a distinctive  $\gamma$ -hydroxybutenolide ring terminus in luffariellolide. This ring may represent a new pharmacophore, allowing a covalent binding, which stabilizes interactions of RAR with its ligands and has never been observed in other RAR ligands. Interestingly, luffariellolide showed activity in RA-resistant cancer cells, in accordance with a divergent mechanism of action from ATRA (Wang et al., 2012). In this quest of new RAR ligands from natural origins, xanthophylls and carotenoids were also studied.  $\beta$ -cryptoxanthin and lutein were shown to bind the RAR ligand-binding domain but not to the RXR ligand-binding domain. Matsumoto et al. suggested that  $\beta$ -cryptoxanthin was able to stimulate differentiation of lung cancer cells and modulate the immune response through Th2 cells via RAR (Matsumoto et al., 2007). Sayo

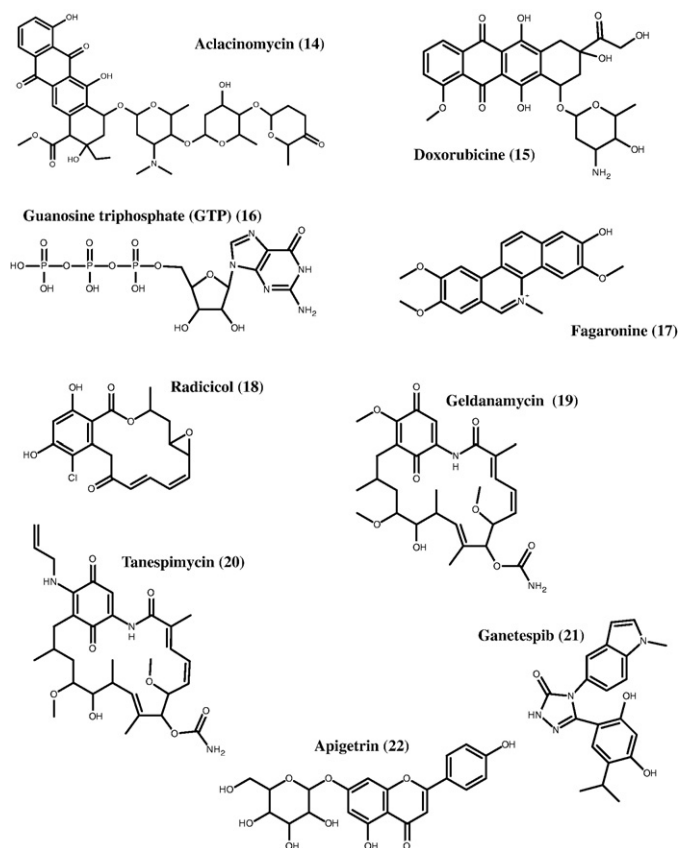
et al. reported that the carotenoid lutein activated hyaluronan synthase (HAS)-3 mRNA expression and hyaluronan synthesis in correlation with the significant increase in retinoic acid responsive element (RARE)-driven transcript activity in keratinocytes. The authors suggested that lutein and zeaxanthin that are non-provitamin A carotenoids, or their metabolites, serve as a ligand for RARs in human keratinocytes (Sayo et al., 2013). These few examples of non-retinoids illustrate the possibility to identify plant-derived natural compounds able to activate the ATRA target receptor RAR. However, leukemia cell differentiation activity has not yet been studied so that they constitute a reservoir of possible drugs to support or substitute to ATRA therapy, notably for APL differentiation therapy.

Involving differential molecular mechanisms compared to AML, CML cells are particularly sensitive to undergo erythroid differentiation. Many natural compounds, including fagaronine (17) and apigetrin (22) or other anthracyclines and HSP90 inhibitors, allowed to experimentally demonstrating the ability of CML cells to differentiate towards the erythroid lineage. These inducers act through distinct mechanisms involving with or without direct inhibition of Bcr–Abl but all compounds activate the key erythroid transcription factor GATA-1. The flavonoid wogonine (12) was shown to induce erythroid differentiation of K562 cells, to activate GATA-1 and to inhibit Bcr–Abl. Of particular interest, this compound was recently reported to induce differentiation and proliferation arrest of primary patient CML cells (Yang, Hui, 2014).

In MM, differentiation of osteoblasts is now considered a therapeutic target with promising outcomes. Molecules from natural origins acted as osteoblastic differentiating agents. Resveratrol (23), acerogenin A (24), silibinin (25) and baicalein (26) were shown to modulate expression and activity of specific markers including bone morphogenetic proteins (Bmps) and key transcription factors Osterix and Runx2. Notably this was the case for silibinin (25), which was reported as inducing differentiation of primary osteoblasts (Ema, Morita, 2014) as well as resveratrol (23) which had synergistic effect with the VD3 (1) on osteoblast differentiation and which inhibits MM development (Boissy, Andersen, 2005).

Considering the complexity of the hematopoietic system, characterized by an interactive regulatory network, the desired effect of a molecule on a specific differentiation program must be evaluated based on the potential impact on another derived or parallel hematopoietic pathways. Indeed, the action of a single molecule can be expected to both induce and repress divergent differentiation pathways. This pleiotropic nature can be illustrated by the effect of VPA (3), which displays antitumor properties and is a well-known inhibitor of Class I HDAC. Side effects have been observed during the several decades of the clinical use of VPA (3) to treat neuropsychiatric disorders, including effects on the hematopoietic system (Chateauvieux et al., 2010). Studies that focused on the ability of VPA (3) to modulate hematopoietic differentiation revealed that this molecule can induce the differentiation of HL60 cells (Deubzer et al., 2006) and leukemic blasts from patients with acute myeloid leukemia (Gottlicher et al., 2001) towards the myeloid pathway. VPA was recently shown to enhance the myeloid differentiation of NB4 cells in combination with ATRA (2) by inducing the CEBP $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  and PU.1 transcription factors (Iriyama, Yuan, 2014). In contrast, we recently showed that VPA (3) inhibits erythroid differentiation by down-regulating GATA-1, FOG-1 and SP1 and up-regulating PU.1 *in vitro* (Chateauvieux et al., 2011). Moreover, VPA (3) inhibited the Epo-mediated erythroid differentiation of TF1 cells and CD34<sup>+</sup>/HSCs. This inhibition was independent of the HDAC inhibitory activity but modulated the regulatory micro-networks that involved hematopoietic-related transcription factors (GATA-1, GATA-2, PU.1, RUNX1) and microRNAs (miR-144/451, miR-27a, miR-155) (Trecul et al., 2014). Interestingly, the increased expression of the myeloid transcription factor PU.1 was accompanied by its inhibitory

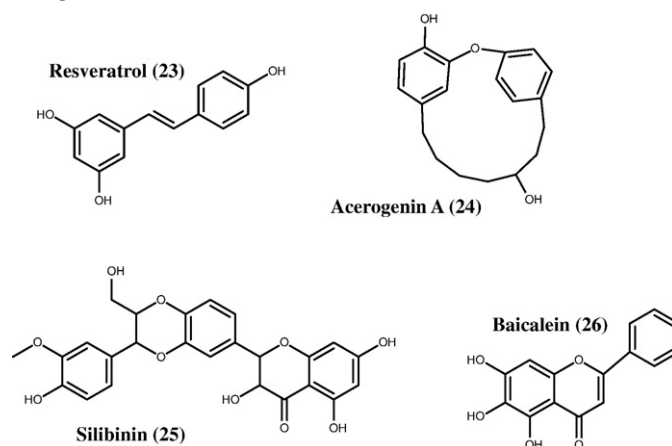
interaction with GATA-1. Furthermore, the up-regulation of GABP $\alpha$ , Fli-1 and Ets1 in Epo-stimulated CD34<sup>+</sup>/HSCs suggested that VPA (3) triggers a switch in the erythro-megakaryocyte pathway in favor of the megakaryocyte differentiation, as observed in Meg-01 cells (Trecul, Morceau, 2014). Apigetrin (22), which specifically induced the erythroid differentiation of K562 cells (Tsolmon, Nakazaki, 2011) but down-regulated the expression of granulocyte (CD11b), monocyte (CD14) and megakaryocyte (CD41a) markers, constitutes another example of a molecule with divergent effects on hematopoietic differentiation pathways. The divergent effects of these molecules on differentiation pathways likely result from modulation of transcription factors and miRNAs, which can play opposite roles in cell differentiation and commitment in the different hematopoietic branches.



Altogether, these studies demonstrate the ability of numerous natural compounds to induce leukemia cell differentiation through different mechanisms concomitantly to cell proliferation arrest. This is encouraging to advance research on differentiation therapy to enhance treatments efficiencies, counteract drugs resistance, decrease cytotoxic effects and improve the patient's quality of life in leukemia as well as in other cancer types. Both in cellulo research as well as clinical trials related to differentiation therapy are currently in progress. Some results of clinical trials have been published in the five last years, mainly on AML treatment (Attar et al., 2013; Deangelo et al., 2014; Iland et al., 2012; Raffoux et al., 2010; Welch et al., 2014). Furthermore, the "clinicaltrials.gov" website, a service of the U.S. National Institutes of Health, allows verifying that differentiation therapy is considered as a true anticancer strategy since 219 studies can be found.

Overall, plant extracts, which have historically been used as therapeutic agents, are continuously revealing novel anticancer properties and

mechanisms and continue to hold prominent promise in future cancer therapies.



## Acknowledgments

SC was supported by postdoctoral grants of Télémie Luxembourg. MO and AT are supported by PhD grants of Télémie Luxembourg. Research at the Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) is financially supported by the "Recherche Cancer et Sang" Foundation, by the "Recherches Scientifiques Luxembourg" association, by the "Een Haerz fir kriibskrank Kanner" association, by the Action LIONS "Vaincre le Cancer" association and by Télémie Luxembourg. MD is supported by the National Research Foundation (NRF), by the Korean Ministry of Education, Science and Technology (MEST) for the Tumor Microenvironment Global Core Research Center (GCRC) grant (Grant No. 2012-0001184). SC is supported by Brain Korea (BK21) PLUS program.

## References

- Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Yamazaki T, et al. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:4990–4.
- Ablain J, de Thé H. Revisiting the differentiation paradigm in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2011;117:5795–802.
- Advani AS, Pendergast AM. Bcr–Abl variants: biological and clinical aspects. *Leuk Res* 2002;26:713–20.
- Athanasiou M, Mavrothalassitis G, Sun-Hoffman L, Blair DG. FLI-1 is a suppressor of erythroid differentiation in human hematopoietic cells. *Leukemia* 2000;14:439–45.
- Attar EC, Johnson JL, Amrein PC, Lozanski G, Wadleigh M, DeAngelo DJ, et al. Bortezomib added to daunorubicin and cytarabine during induction therapy and to intermediate-dose cytarabine for consolidation in patients with previously untreated acute myeloid leukemia age 60 to 75 years: CALGB (Alliance) study 10502. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2013;31:923–9.
- Baum KJ, Ren R. Effect of Ras inhibition in hematopoiesis and BCR/ABL leukemogenesis. *J Hematol Oncol* 2008;1:5.
- Baumann S, Fas SC, Giaisi M, Muller WW, Merling A, Gulow K, et al. Wogonin preferentially kills malignant lymphocytes and suppresses T-cell tumor growth by inducing PLCgamma1<sup>-</sup> and Ca2<sup>+</sup>-dependent apoptosis. *Blood* 2008;111:2354–63.
- Beutler JA, Karbon EW, Brubaker AN, Malik R, Curtis DR, Enna SJ. Securinine alkaloids: a new class of GABA receptor antagonist. *Brain Res* 1985;330:135–40.
- Blaheta RA, Cinatl Jr J. Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. *Med Res Rev* 2002;22:492–511.
- Blobel GA, Nakajima T, Eckner R, Montminy M, Orkin SH. CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2061–6.
- Boissy P, Andersen TL, Abdallah BM, Kassem M, Plesner T, Delaisse JM. Resveratrol inhibits myeloma cell growth, prevents osteoclast formation, and promotes osteoblast differentiation. *Cancer Res* 2005;65:9943–52.
- Breitman TR, Selonick SE, Collins SJ. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:2936–40.
- Bresnick EH, Lee HY, Fujiwara T, Johnson KD, Keles S. GATA switches as developmental drivers. *J Biol Chem* 2010;285:31087–93.
- Brown G, Choudhry MA, Durham J, Drayson MT, Michell RH. Monocytically differentiating HL60 cells proliferate rapidly before they mature. *Exp Cell Res* 1999;253:511–8.
- Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:3828–32.

- Broxmeyer HE, Cooper S, Hangoc G, Kim CH. Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 selectively counteracts inhibitory effects of myelosuppressive chemokines on hematopoietic progenitor cell proliferation in vitro. *Stem Cells Dev* 2005;14:199–203.
- Buck I, Morceau F, Cristofanon S, Heintz C, Chateauvieux S, Reuter S, et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits erythroid differentiation in human erythropoietin-dependent cells involving p38 MAPK pathway, GATA-1 and FOG-1 downregulation and GATA-2 upregulation. *Biochem Pharmacol* 2008;76:1229–39.
- Buck I, Morceau F, Cristofanon S, Reuter S, Dicato M, Diederich M. The inhibitory effect of the proinflammatory cytokine TNFalpha on erythroid differentiation involves erythroid transcription factor modulation. *Int J Oncol* 2009a;34:853–60.
- Buck I, Morceau F, Grigorakaki C, Dicato M, Diederich M. Linking anemia to inflammation and cancer: the crucial role of TNFalpha. *Biochem Pharmacol* 2009b;77:1572–9.
- Burger PE, Dowdle EB, Lukey PT, Wilson EL. Basic fibroblast growth factor antagonizes transforming growth factor beta-mediated erythroid differentiation in K562 cells. *Blood* 1994;83:1808–12.
- Caironi R, Beghini A, Grillo G, Nadali G, Elice F, Ripamonti CB, et al. Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study. *Blood* 2006;107:3463–8.
- Care RS, Valk PJ, Goodeve AC, Abu-Duhier FM, Geertsma-Kleinekoort WM, Wilson GA, et al. Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 2003;121:775–7.
- Castaigne S, Chomienne C, Daniel MT, Ballerini P, Berger R, Fenaux P, et al. All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I clinical results. *Blood* 1990;76:1704–9.
- Chan HL, Yip HY, Mak NK, Leung KN. Modulatory effects and action mechanisms of tryptanthrin on murine myeloid leukemia cells. *Cell Mol Immunol* 2009;6:335–42.
- Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010.
- Chateauvieux S, Eifes S, Morceau F, Grigorakaki C, Schnekenburger M, Henry E, et al. Valproic acid perturbs hematopoietic homeostasis by inhibition of erythroid differentiation and activation of the myelo-monocytic pathway. *Biochem Pharmacol* 2011;81:498–509.
- Chaturvedi P, Sharma S, Reddy EP. Abrogation of interleukin-3 dependence of myeloid cells by the v-src oncogene requires SH2 and SH3 domains which specify activation of STATs. *Mol Cell Biol* 1997;17:3295–304.
- Chen Y, Sprung R, Tang Y, Ball H, Sangras B, Kim SC, et al. Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones. *Mol. Cell. Proteomics* 2007;6:812–9.
- Chen Y, Lu N, Ling Y, Gao Y, Wang L, Sun Y, et al. Wogonoside inhibits lipopolysaccharide-induced angiogenesis in vitro and in vivo via toll-like receptor 4 signal transduction. *Toxicology* 2009;259:10–7.
- Chen Y, Hui H, Yang H, Zhao K, Qin Y, Gu C, et al. Wogonoside induces cell cycle arrest and differentiation by affecting expression and subcellular localization of PLSCR1 in AML cells. *Blood* 2013;121:3682–91.
- Darley RL, Pearn L, Omidvar N, Sweeney M, Fisher J, Phillips S, et al. Protein kinase C mediates mutant N-Ras-induced developmental abnormalities in normal human erythroid cells. *Blood* 2002;100:4185–92.
- Deangelo DJ, Neuberg D, Amrein PC, Berchuck J, Wadleigh M, Sirulnik LA, et al. A phase II study of the EGFR inhibitor gefitinib in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2014;38:430–4.
- Detmer K, Walker AN, Jenkins TM, Steele TA, Dannawi H. Erythroid differentiation in vitro is blocked by cyclopamine, an inhibitor of hedgehog signaling. *Blood Cells Mol Dis* 2000;26:360–72.
- Deubzer H, Busche B, Ronndahl G, Eikel D, Michaelis M, Cinatl J, et al. Novel valproic acid derivatives with potent differentiation-inducing activity in myeloid leukemia cells. *Leuk Res* 2006;30:1167–75.
- Di Bacco A, Keeshan K, McKenna SL, Cotter TG. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. *Oncologist* 2000;5:405–15.
- Dore LC, Crispino JD. Transcription factor networks in erythroid cell and megakaryocyte development. *Blood* 2011;118:231–9.
- Dore LC, Chlon TM, Brown CD, White KP, Crispino JD. Chromatin occupancy analysis reveals genome-wide GATA factor switching during hematopoiesis. *Blood* 2012;119:3724–33.
- Dupont C, Couillerot E, Gillet R, Caron C, Zeches-Hanrot M, Riou JF, et al. The benzophenanthridine alkaloid fagaronine induces erythroleukemic cell differentiation by gene activation. *Planta Med* 2005;71:489–94.
- Elagib KE, Racke FK, Mogass M, Khetawat R, Delehanty LL, Goldfarb AN. RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood* 2003;101:4333–41.
- Ema H, Morita Y, Suda T. Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2014;42:74–82.
- Fenaux P, Wang ZZ, Degos L. Treatment of acute promyelocytic leukemia by retinoids. *Curr Top Microbiol Immunol* 2007;313:101–28.
- Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipens S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 2005;25:1215–27.
- Freemantle SJ, Spinella MJ, Dmitrovsky E. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene* 2003;22:7305–15.
- Friedman AD, Keefer JR, Kummalue T, Liu H, Wang QF, Cleaves R. Regulation of granulocyte and monocyte differentiation by CCAAT/enhancer binding protein alpha. *Blood Cells Mol Dis* 2003;31:338–41.
- Garcia P, Berlanga O, Vegiopoulos A, Vyas P, Frampton J. c-Myb and GATA-1 alternate dominant roles during megakaryocyte differentiation. *Genes Cells* 2011;9:1572–81.
- Gelmetti V, Zhang J, Fanelli M, Minucci S, Pelicci PG, Lazar MA. Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO. *Mol Cell Biol* 1998;18:7185–91.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004;5:R80.
- Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia—advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 2003;349:1451–64.
- Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 2001;20:6969–78.
- 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;94:87–96.
- Grigorakaki C, Morceau F, Chateauvieux S, Dicato M, Diederich M. Tumor necrosis factor alpha-mediated inhibition of erythropoiesis involves GATA-1/GATA-2 balance impairment and PU.1 over-expression. *Biochem Pharmacol* 2011;82:156–66.
- Gupta K, Chakrabarti A, Rana S, Ramdeo R, Roth BL, Agarwal ML, et al. Securinine, a myeloid differentiation agent with therapeutic potential for AML. *PLoS One* 2011;6. [e21203].
- Gutierrez P, Delgado MD, Richard C, Moreau-Gachelin F, Leon J. Interferon induces up-regulation of Spi-1/PU.1 in human leukemia K562 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;240:862–8.
- Hantschel O, Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr–Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:33–44.
- Hara ES, Ono M, Kubota S, Sonoyama W, Oida Y, Hattori T, et al. Novel chondrogenic and chondroprotective effects of the natural compound harmine. *Biochimie* 2013;95:374–81.
- Harigae H, Takahashi S, Suwabe N, Ohtsu H, Gu L, Yang Z, et al. Differential roles of GATA-1 and GATA-2 in growth and differentiation of mast cells. *Genes Cells* 1998;3:39–50.
- Hart A, Melet F, Grossfeld P, Chien K, Jones C, Tunnacliffe A, et al. Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygotously deleted in patients with thrombocytopenia. *Immunity* 2000;13:167–77.
- Hatano R, Takano F, Fushiya S, Michimata M, Tanaka T, Kazama I, et al. Water-soluble extracts from *Angelica acutiloba* Kitagawa enhance hematopoiesis by activating immature erythroid cells in mice with 5-fluorouracil-induced anemia. *Exp Hematol* 2004;32:918–24.
- Heisterkamp N, Groffen J. Molecular insights into the Philadelphia translocation. *Hematol Pathol* 1991;5:1–10.
- Hirasawa R, Shimizu R, Takahashi S, Osawa M, Takayanagi S, Kato Y, et al. Essential and instructive roles of GATA factors in eosinophil development. *J Exp Med* 2002;195:1379–86.
- Honma Y, Okabe-Kado J, Hozumi M, Uehara Y, Mizuno S. Induction of erythroid differentiation of K562 human leukemic cells by herbimycin A, an inhibitor of tyrosine kinase activity. *Cancer Res* 1989;49:331–4.
- Honma Y, Okabe-Kado J, Kasukabe T, Hozumi M, Umezawa K. Inhibition of abl oncogene tyrosine kinase induces erythroid differentiation of human myelogenous leukemia K562 cells. *Jpn J Cancer Res* 1990;81:1132–6.
- Horita M, Andreu EJ, Benito A, Arbona C, Sanz C, Benet I, et al. Blockade of the Bcr–Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med* 2000;191:977–84.
- Huang Y, Zhao Q, Zhou CX, Gu ZM, Li D, Xu HZ, et al. Antileukemic roles of human phospholipid scramblase 1 gene, evidence from inducible PLSCR1-expressing leukemic cells. *Oncogene* 2006;25:6618–27.
- Huang KF, Zhang GD, Huang YQ, Diao Y. Wogonin induces apoptosis and down-regulates survivin in human breast cancer MCF-7 cells by modulating PI3K-AKT pathway. *Int Immunopharmacol* 2012;12:334–41.
- Ikemoto S, Sugimura K, Yoshida N, Yasumoto R, Wada S, Yamamoto K, et al. Antitumor effects of *Scutellariae* radix and its components baicalein, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines. *Urology* 2000;55:951–5.
- Ikonomi P, Noguchi CT, Miller W, Kassahun H, Hardison R, Schechter AN. Levels of GATA-1/GATA-2 transcription factors modulate expression of embryonic and fetal hemoglobins. *Gene* 2000a;261:277–87.
- Ikonomi P, Rivera C, Riordan M, Washington G, Schechter AN, Noguchi CT. Overexpression of GATA-2 inhibits erythroid and promotes megakaryocyte differentiation. *Exp Hematol* 2000b;28:1423–31.
- Iland HJ, Bradstock K, Supple SG, Catalano A, Collins M, Hertzberg M, et al. All-trans-retinoic acid, idarubicin, and IV arsenic trioxide as initial therapy in acute promyelocytic leukemia (APML4). *Blood* 2012;120:1570–80. [quiz 752].
- Ilaria Jr RL, Van Etten RA. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem* 1996;271:31704–10.
- Iriyama N, Yuan B, Yoshino Y, Hatta Y, Horikoshi A, Aizawa S, et al. Enhancement of differentiation induction and upregulation of CCAAT/enhancer-binding proteins and PU.1 in NB4 cells treated with combination of ATRA and valproic acid. *Int J Oncol* 2014;44:865–73.
- Jeannesson P, Lahlil R, Chenais B, Devy L, Gillet R, Aries A, et al. Anthracyclines as tumor cell differentiating agents: effects on the regulation of erythroid gene expression. *Leuk Lymphoma* 1997;26:575–87.
- Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production. *J Physiol* 2011;589:1251–8.
- Johnson DE, Redner RL. An ATTRACTIVE future for differentiation therapy in AML. *Blood Rev* 2015.
- Kihara T, Ichikawa S, Yonezawa T, Lee JW, Akihisa T, Woo JT, et al. Acerogenin A, a natural compound isolated from *Acer nikoense* Maxim, stimulates osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein action. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;406:211–7.
- Kim JM, Lee SU, Kim YS, Min YK, Kim SH. Baicalein stimulates osteoblast differentiation via coordinating activation of MAP kinases and transcription factors. *J Cell Biochem* 2008;104:1906–17.

- Koschmieder S, Halmos B, Levantini E, Tenen DG. Dysregulation of the C/EBPalpha differentiation pathway in human cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009;27:619–28.
- Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 1988;319:990–8.
- Lecanu L, Hashim AI, McCourtly A, Papadopoulos V. A steroid isolated from the water mold *Achlya heterossexualis* induces neurogenesis in vitro and in vivo. *Steroids* 2012;77:224–32.
- Leszczyniecka M, Roberts T, Dent P, Grant S, Fisher PB. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. *Pharmacol Ther* 2001;90:105–56.
- Libregts SF, Gutierrez L, de Bruin AM, Wensveen FM, Papadopoulos P, van Ijcken W, et al. Chronic IFN-gamma production in mice induces anemia by reducing erythrocyte life span and inhibiting erythropoiesis through an IRF-1/PU.1 axis. *Blood* 2011;118:2578–88.
- Lim BO. Effects of wogonin, wogonoside, and 3,5,7,2',6'-pentahydroxyflavone on chemical mediator production in peritoneal exudate cells and immunoglobulin E of rat mesenteric lymph node lymphocytes. *J Ethnopharmacol* 2003;84:23–9.
- Liu B, Ohishi K, Yamamura K, Suzuki K, Monma F, Ino K, et al. A potential activity of valproic acid in the stimulation of interleukin-3-mediated megakaryopoiesis and erythropoiesis. *Exp Hematol* 2010;38:685–95.
- Lubick K, Radke M, Jutila M. Securinine, a GABAA receptor antagonist, enhances macrophage clearance of phase II *C. burnetii*: comparison with TLR agonists. *J Leukoc Biol* 2007;82:1062–9.
- Mandanas RA, Leibowitz DS, Gharebaghi K, Tauchi T, Burgess GS, Miyazawa K, et al. Role of p21 RAS in p210 bcr-abl transformation of murine myeloid cells. *Blood* 1993;82:1838–47.
- Marchwicka A, Cebrat M, Sampath P, Sniezewski L, Marcinkowska E. Perspectives of differentiation therapies of acute myeloid leukemia: the search for the molecular basis of patients' variable responses to 1,25-dihydroxyvitamin D and vitamin D analogs. *Front. Oncol.* 2014;4:125.
- Marcinkowska E, Garay E, Gocsek E, Chrobak A, Wang X, Studzinski GP. Regulation of C/EBPbeta isoforms by MAPK pathways in HL60 cells induced to differentiate by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Exp Cell Res* 2006;312:2054–65.
- Mathieu J, Ruohola-Baker H. Regulation of stem cell populations by microRNAs. *Adv Exp Med Biol* 2013;786:329–51.
- Matsumoto A, Mizukami H, Mizuno S, Umegaki K, Nishikawa J, Shudo K, et al. betacryptoxanthin, a novel natural RAR ligand, induces ATP-binding cassette transporters in macrophages. *Biochem Pharmacol* 2007;74:256–64.
- Miccio A, Wang Y, Hong W, Gregory GD, Wang H, Yu X, et al. NuRD mediates activating and repressive functions of GATA-1 and FOG-1 during blood development. *EMBO J* 2010;29:442–56.
- Moise AR, Noy N, Palczewski K, Blaner WS. Delivery of retinoid-based therapies to target tissues. *Biochemistry* 2007;46:4449–58.
- Molkentin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* 2000;275:38949–52.
- Morceau F, Aries A, Lahilil R, Devy L, Jardillier JC, Jeannesson P, et al. Evidence for distinct regulation processes in the acacinomycin- and doxorubicin-mediated differentiation of human erythroleukemic cells. *Biochem Pharmacol* 1996a;51:839–45.
- Morceau F, Chenais B, Gillet R, Jardillier JC, Jeannesson P, Trentesaux C. Transcriptional and posttranscriptional regulation of erythroid gene expression in anthracycline-induced differentiation of human erythroleukemic cells. *Cell Growth Differ* 1996b;7:1023–9.
- Morceau F, Dupont C, Palissot V, Borde-Chiche P, Trentesaux C, Dicato M, et al. GTP-mediated differentiation of the human K562 cell line: transient overexpression of GATA-1 and stabilization of the gamma-globin mRNA. *Leukemia* 2000;14:1589–97.
- Morceau F, Schnekenburger M, Blasius R, Buck I, Dicato M, Diederich M. Tumor necrosis factor alpha inhibits acacinomycin A-induced erythroid differentiation of K562 cells via GATA-1. *Cancer Lett* 2006;240:203–12.
- Morceau F, Buck I, Dicato M, Diederich M. Radicol-mediated inhibition of Bcr-Abl in K562 cells induced p38-MAPK dependent erythroid differentiation and PU.1 down-regulation. *Biofactors* 2008;34:313–29.
- Morceau F, Dicato M, Diederich M. Pro-inflammatory cytokine-mediated anemia: regard of molecular mechanisms of erythropoiesis. *Mediators Inflamm* 2009;2009:405016.
- Moreau-Gachelin F, Wendling F, Molina T, Denis N, Titeux M, Grimber G, et al. Spi-1/PU.1 transgenic mice develop multistep erythroleukemias. *Mol Cell Biol* 1996;16:2453–63.
- Musialik E, Bujko M, Kober P, Grygorowicz MA, Libura M, Przeźrzelka M, et al. Comparison of promoter DNA methylation and expression levels of genes encoding CCAAT/enhancer binding proteins in AML patients. *Leuk Res* 2014;38:850–6.
- Nagar B, Hantschel O, Young MA, Scheffzek K, Veach D, Bornmann W, et al. Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* 2003;112:859–71.
- Nagy L, Kao HY, Love JD, Li C, Banayo E, Gooch JT, et al. Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev* 1999;13:3209–16.
- Nakamaki T, Okabe-Kado J, Yamamoto-Yamaguchi Y, Hino K, Tomoyasu S, Honma Y, et al. Role of MmTRA1b/phospholipid scramblase 1 gene expression in the induction of differentiation of human myeloid leukemia cells into granulocytes. *Exp Hematol* 2002;30:421–9.
- Neubauer A, Dodge RK, George SL, Davey FR, Silver RT, Schiffer CA, et al. Prognostic importance of mutations in the ras proto-oncogenes in de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 1994;83:1603–11.
- Newmark HL, Lupton JR, Young CW. Butyrate as a differentiating agent: pharmacokinetics, analogs and current status. *Cancer Lett* 1994;78:1–5.
- Okamoto R, Akagi T, Koeffler P. Vitamin D compounds and myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma* 2008;49:12–3.
- Osti F, Corradini FG, Hanau S, Matteuzzi M, Gambari R. Human leukemia K562 cells: induction to erythroid differentiation by guanine, guanosine and guanine nucleotides. *Haematologica* 1997;82:395–401.
- Pae HO, Oh H, Choi BM, Oh GS, Paik SG, Jeong S, et al. Differentiation-inducing effects of verticinone, an isosteroidal alkaloid isolated from the bulb of *Fritillaria ussuriensis*, on human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biol Pharm Bull* 2002;25:1409–11.
- Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, et al. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* 1996;88:2410–4.
- Pang L, Xue H, Szalai G, Wang X, Wang Y, Watson DK, et al. Maturation stage-specific regulation of megakaryopoiesis by pointed-domain Ets proteins. *Blood* 2006;108:2198–206.
- Paquette RL, Koeffler HP. Differentiation therapy. *Hematol Oncol Clin North Am* 1992;6:687–706.
- Petrie K, Zelent A, Waxman S. Differentiation therapy of acute myeloid leukemia: past, present and future. *Curr Opin Hematol* 2009;16:84–91.
- Pevny L, Lin CS, D'Agati V, Simon MC, Orkin SH, Costantini F. Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* 1995;121:163–72.
- Powers MV, Workman P. Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. *Endocr Relat Cancer* 2006;13(Suppl. 1):S125–35.
- Raffoux E, Cras A, Recher C, Boelle PY, de Labarthe A, Turlure P, et al. Phase 2 clinical trial of 5-azacitidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in patients with high-risk acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. *Oncotarget* 2010;1:34–42.
- Rana S, Gupta K, Gomez J, Matsuyama S, Chakrabarti A, Agarwal ML, et al. Securinine induces p73-dependent apoptosis preferentially in p53-deficient colon cancer cells. *FASEB J.* 2010;24:2126–34.
- Reddy VA, Iwama A, Iotzova G, Schulz M, Elsasser A, Vangala RK, et al. Granulocyte inducer C/EBPalpha inactivates the myeloid master regulator PU.1: possible role in lineage commitment decisions. *Blood* 2002;100:483–90.
- Reiss M, Gamba-Vitalo C, Sartorelli AC. Induction of tumor cell differentiation as a therapeutic approach: preclinical models for hematopoietic and solid neoplasms. *Cancer Treat Rep* 1986;70:201–18.
- Reuther JY, Reuther GW, Cortez D, Pendergast AM, Baldwin Jr AS. A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev* 1998;12:968–81.
- Romeo PH, Prandini MH, Joulin V, Mignonet V, Prenant M, Vainchenker W, et al. Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature* 1990;344:447–9.
- 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;36:624–30.
- Rulina AV, Spirin PV, Prassolov VS. Activated leukemic oncogenes AML1-ETO and c-kit: role in development of acute myeloid leukemia and current approaches for their inhibition. *Biochem. Biokhimia* 2010;75:1650–66.
- Sahu SK, Gummadi SN, Manoj N, Aradhyam GK. Phospholipid scramblases: an overview. *Arch Biochem Biophys* 2007;462:103–14.
- Sato S, Sakashita A, Ishiyama T, Nakamaki T, Hino K, Tomoyasu S, et al. Possible differentiation treatment with acacinomycin A in acute myelomonocytic leukemia refractory to conventional chemotherapy. *Anticancer Res* 1992;12:371–6.
- Sawyers CL, Denny CT, Witte ON. Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis. *Cell* 1991;64:337–50.
- Sawyers CL, McLaughlin J, Witte ON. Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. *J Exp Med* 1995;181:307–13.
- Sayo T, Sugiyama Y, Inoue S, Lutein, a nonprovitamin A, activates the retinoic acid receptor to induce HAS3-dependent hyaluronan synthesis in keratinocytes. *Biosci Biotechnol Biochem* 2013;77:1282–6.
- Schnur RC, Corman ML, Gallaschun RJ, Cooper BA, Dee MF, Doty JL, et al. erbB-2 oncogene inhibition by geldanamycin derivatives: synthesis, mechanism of action, and structure-activity relationships. *J Med Chem* 1995;38:3813–20.
- Schulte TW, Akinaga S, Soga S, Sullivan W, Stensgard B, Toft D, et al. Antibiotic radicicol binds to the N-terminal domain of Hsp90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cell Stress Chaperones* 1998;3:100–8.
- Shia WJ, Okumura AJ, Yan M, Sarkeshik A, Lo MC, Matsuura S, et al. PRMT1 interacts with AML1-ETO to promote its transcriptional activation and progenitor cell proliferative potential. *Blood* 2012;119:4953–62.
- Sillaber C, Gesbert F, Frank DA, Sattler M, Griffin JD. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood* 2000;95:2118–25.
- Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, et al. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J* 1997;16:6151–61.
- Song HD, Sun XJ, Deng M, Zhang GW, Zhou Y, Wu XY, et al. Hematopoietic gene expression profile in zebrafish kidney marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:16240–5.
- Supko JG, Hickman RL, Grever MR, Malspeis L. Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995;36:305–15.
- Szalai G, LaRue AC, Watson DK. Molecular mechanisms of megakaryopoiesis. *Cell. Mol. Life Sci.* CMLS 2006;63:2460–76.
- Tabe Y, Konopleva M, Munsell MF, Marini FC, Zompetta C, McQueen T, et al. PML-RARalpha is associated with leptin-receptor induction: the role of mesenchymal stem cell-derived adipocytes in APL cell survival. *Blood* 2004;103:1815–22.
- Tai MC, Tsang SY, Chang LY, Xue H. Therapeutic potential of wogonin: a naturally occurring flavonoid. *CNS Drug Rev* 2005;11:141–50.
- Takahashi T, Kawakami K, Mishima S, Akimoto M, Takenaga K, Suzumiya J, et al. Cyclopamine induces eosinophilic differentiation and upregulates CD44 expression in myeloid leukemia cells. *Leuk Res* 2011;35:638–45.
- Tanabe H, Yasui T, Kotani H, Nagatsu A, Makishima M, Amagaya S, et al. Retinoic acid receptor agonist activity of naturally occurring diterpenes. *Bioorg Med Chem* 2014;22:3204–12.
- Tanaka H, Abe E, Miyaura C, Shiina Y, Suda T. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 induces differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) into monocyte-macrophages, but not into granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;117:86–92.

- Tang JL, Hou HA, Chen CY, Liu CY, Chou WC, Tseng MH, et al. AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood* 2009;114:5352–61.
- Tokunaga M, Ezoe S, Tanaka H, Satoh Y, Fukushima K, Matsui K, et al. BCR–ABL but not JAK2 V617F inhibits erythropoiesis through the Ras signal by inducing p21CIP1/WAF1. *J Biol Chem* 2010;285:31774–82.
- Trecul A, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Dietary compounds as potent inhibitors of the signal transducers and activators of transcription (STAT) 3 regulatory network. *Genes Nutr* 2012;7:111–25.
- Trecul A, Morceau F, Gaigneaux A, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M. Valproic acid regulates erythro-megakaryocytic differentiation through the modulation of transcription factors and microRNA regulatory micro-networks. *Biochem Pharmacol* 2014;92:299–311.
- Trentesaux C, Nyoung MN, Aries A, Morceau F, Ronchi A, Ottolenghi S, et al. Increased expression of GATA-1 and NFE-2 erythroid-specific transcription factors during acclacinomycin-mediated differentiation of human erythroleukemic cells. *Leukemia* 1993;7:452–7.
- Tsang AP, Visvader JE, Turner CA, Fujiwara Y, Yu C, Weiss MJ, et al. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* 1997;90:109–19.
- Tsolmon S, Nakazaki E, Han J, Isoda H. Apigetrin induces erythroid differentiation of human leukemia cells K562: proteomics approach. *Mol Nutr Food Res* 2011;55(Suppl. 1):S93–S102.
- Vegiopoulos A, Garcia P, Emambokus N, Frampton J. Coordination of erythropoiesis by the transcription factor c-Myb. *Blood* 2006;107:4703–10.
- Vicente C, Conchillo A, Garcia-Sanchez MA, Odero MD. The role of the GATA2 transcription factor in normal and malignant hematopoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2012;82:1–17.
- Wadman IA, Osada H, Grutz GG, Agulnick AD, Westphal H, Forster A, et al. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J* 1997;16:3145–57.
- Wang W, Guo Q, You Q, Zhang K, Yang Y, Yu J, et al. Involvement of bax/bcl-2 in wogonin-induced apoptosis of human hepatoma cell line SMMC-7721. *Anticancer Drugs* 2006a;17:797–805.
- Wang W, Guo QL, You QD, Zhang K, Yang Y, Yu J, et al. The anticancer activities of wogonin in murine sarcoma S180 both in vitro and in vivo. *Biol Pharm Bull* 2006b;29:1132–7.
- Wang S, Wang Z, Lin S, Zheng W, Wang R, Jin S, et al. Revealing a natural marine product as a novel agonist for retinoic acid receptors with a unique binding mode and inhibitory effects on cancer cells. *Biochem J* 2012;446:79–87.
- Welch JS, Niu H, Uy GL, Westervelt P, Abboud CN, Vij R, et al. A phase I dose escalation study of oral bexarotene in combination with intravenous decitabine in patients with AML. *Am J Hematol* 2014;89:E103–8.
- Wen Q, Goldenson B, Crispino JD. Normal and malignant megakaryopoiesis. *Expert Rev Mol Med* 2011;13. [e32].
- Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 2005;5:761–72.
- Wickrema A, Crispino JD. Erythroid and megakaryocytic transformation. *Oncogene* 2007;26:6803–15.
- Wouters BJ, Lowenberg B, Eipelinck-Verschueren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* 2009;113:3088–91.
- Wu X, Chen H, Sun J, Peng Y, Liang Y, Wang G, et al. Development and validation of a liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of verticinone in rat plasma and its application to pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010;878:2067–71.
- Yang H, Hui H, Wang Q, Li H, Zhao K, Zhou Y, et al. Wogonin induces cell cycle arrest and erythroid differentiation in imatinib-resistant K562 cells and primary CML cells. *Oncotarget* 2014;5:8188–201.
- Yoshida H, Kitamura K, Tanaka K, Omura S, Miyazaki T, Hachiya T, et al. Accelerated degradation of PML-retinoic acid receptor alpha (PML-RARA) oncoprotein by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: possible role of the proteasome pathway. *Cancer Res* 1996;56:2945–8.
- Zhang P, Zhang X, Iwama A, Yu C, Smith KA, Mueller BU, et al. PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood* 2000;96:2641–8.
- Zhang K, Guo QL, You QD, Yang Y, Zhang HW, Yang L, et al. Wogonin induces the granulocytic differentiation of human NB4 promyelocytic leukemia cells and up-regulates phospholipid scramblase 1 gene expression. *Cancer Sci* 2008a;99:689–95.
- Zhang SJ, Ma LY, Huang QH, Li C, Gu BW, Gao XD, et al. Gain-of-function mutation of GATA-2 in acute myeloid transformation of chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008b;105:2076–81.
- Zheng X, Oancea C, Henschler R, Ruthardt M. Cooperation between constitutively activated c-Kit signaling and leukemogenic transcription factors in the determination of the leukemic phenotype in murine hematopoietic stem cells. *Int J Oncol* 2009;34:1521–31.
- Zhou Q, Zhao J, Wiedmer T, Sims PJ. Normal hemostasis but defective hematopoietic response to growth factors in mice deficient in phospholipid scramblase 1. *Blood* 2002;99:4030–8.



## RESUME

L'anémie est un symptôme fréquent chez les patients atteints de cancer. La libération de la cytokine pro-inflammatoire TNF $\alpha$ , un inhibiteur connu de l'érythropoïèse, en est l'une des causes. L'érythropoïèse est un processus nécessitant l'arrêt de la prolifération et l'autophagie. Les résultats précédents ont montré que le TNF $\alpha$  inhibe l'expression des marqueurs érythroïdes et module l'expression de facteurs de transcription (FT) hématopoïétiques. Notre objectif est d'étudier l'implication de la voie TNF $\alpha$ /sphingomyélinase (SMase)/céramide dans l'inhibition de l'érythropoïèse en utilisant des cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> induites à se différencier par l'érythropoïétine recombinante (Epo). Par l'utilisation de céramides exogènes, de SMase bactérienne et d'inhibiteurs de SMases, nous montrons l'implication de la voie SMase/céramide dans l'inhibition de l'expression des marqueurs érythroïdes mais également dans l'induction de la différenciation myéloïde avec une augmentation de l'expression du CD11b. Cet effet sur la différenciation est corrélé à la modulation du réseau FT/miR impliquant GATA-1, GATA-2 et PU.1 et les miR-144, 451, 155, 146a et 223. De plus, l'analyse par microscopie électronique à transmission, l'absence de formation de *punctae* GFP-LC3 et l'accumulation de SQSTM1/p62 montrent que le TNF $\alpha$  et les céramides inhibent l'autophagie induite par l'Epo. L'analyse des protéines impliquées dans la régulation de l'autophagie montre que le TNF $\alpha$  et les céramides activent mTOR. Son implication est confirmée par l'utilisation de rapamycine et l'inhibition de ULK1 et Atg13. De plus, le TNF $\alpha$  et les céramides inhibent l'expression de bécline 1 et de la formation du complexe Atg5-Atg12. Ces résultats démontrent que la voie TNF $\alpha$ /SMase/céramide joue un rôle dans l'homéostasie hématopoïétique par l'inhibition de l'érythropoïèse au profit de la myélopoïèse, en impactant les réseaux de régulation FT/miR et le processus d'autophagie.

Mots clés: TNF $\alpha$ , sphingolipides, érythropoïèse, myélopoïèse, autophagie

## ABSTRACT

Anemia is a common symptom in cancer patients. It can be caused by the release of pro-inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$ , a known inhibitor of erythropoiesis. Erythropoiesis involves proliferation arrest and autophagy. Our previous studies showed that TNF $\alpha$  inhibits the expression of erythroid markers as well as hematopoietic transcription factors (TF) expression. The aim is to study the involvement of TNF $\alpha$ /sphingomyelinase (SMase)/ceramide pathway in erythropoiesis inhibition using recombinant erythropoietin (Epo)-induced CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells. Using exogenous ceramides, a bacterial SMase and sphingomyelinase inhibitors, we show the involvement of SMase/ceramide pathway in the inhibition of erythroid markers as well as the induction of myeloid differentiation as shown by the increase in CD11b expression. This effect is correlated to the modulation of the TF/miR network involving GATA-1, GATA-2 and PU.1 as well as miR-144, 451, 155, 146a and 223. We show that TNF $\alpha$  and ceramides inhibit Epo-induced autophagy through transmission electron microscopy analysis, the absence of GFP-LC3 *punctae* formation and SQSTM1/p62 accumulation. Analysis of proteins involved in autophagy regulation showed that TNF $\alpha$  and ceramides activate mTOR, which is confirmed using rapamycin as well as the inhibition of ULK1 and Atg13. Moreover, TNF $\alpha$  and ceramides inhibit Beclin 1 expression and Atg5-Atg12 complex formation. These results demonstrate the role of TNF $\alpha$ /SMase/ceramide pathway in hematopoietic homeostasis through an erythropoiesis-myelopoiesis switch resulting from perturbation of TF/miR network and autophagy.

Key words: TNF $\alpha$ , sphingolipids, erythropoiesis, myelopoiesis, autophagy