



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle du facteur CXXC5 (RINF) au cours de l'hématopoïèse normale et pathologique

Gabriel Matherat

► **To cite this version:**

Gabriel Matherat. Caractérisation fonctionnelle du facteur CXXC5 (RINF) au cours de l'hématopoïèse normale et pathologique. Hématologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCB223 . tel-02524729

HAL Id: tel-02524729

<https://theses.hal.science/tel-02524729>

Submitted on 30 Mar 2020

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.

Université Paris Descartes

Ecole Doctorale n°561 : Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies

*Institut Cochin / Equipe Patrick Mayeux & Didier Bouscary
Inserm u1016 / Département Développement, Reproduction, Cancer*

Caractérisation fonctionnelle du facteur CXXC5 (RINF) au cours de l'hématopoïèse normale et pathologique

Par

Gabriel Matherat

Thèse de doctorat d'hématologie

Présentation et soutenance prévue publiquement le 22 Novembre 2018

JURY

Pr Emmanuel Gyan

Rapporteur

Dr Estelle Duprez

Rapporteur

Pr Lydie Da Costa

Examineur

Dr Sophie Vaulont

Examineur

Dr Dominique Bluteau

Examineur

Dr Frederic Pendino

Directeur de Thèse

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier chacun des membres du jury d'avoir bien voulu accepter d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie **Estelle Duprez** et **Emmanuel Gyan** d'avoir pris le temps d'examiner mon manuscrit de thèse et de m'avoir fait part de leurs précieuses corrections. Je remercie vivement **Sophie Vulont** et **Lydie Da Costa** pour leur présence et leur participation à cette soutenance. Je remercie également chaleureusement **Dominique Bluteau** de m'avoir suivi depuis mon jury de mi-parcours jusqu'à aujourd'hui.

Je remercie sincèrement **Patrick Mayeux** de m'avoir accepté dans son laboratoire.

Je remercie du fond du cœur **Frederic Pendino** de m'avoir accueilli dans son équipe à partir de mon M2, de m'avoir fait confiance sur la réalisation de mon projet et de m'avoir permis d'effectuer une thèse dans la continuité de celui-ci, ce qui est vraiment une chance. J'ai beaucoup appris aussi bien sur le plan personnel que professionnel. Bien que cette troisième année fût sportive, j'en garde de très bons souvenirs !

Je remercie **Isabelle Munoz** pour sa venue dans l'équipe, tu es vraiment chouette, volontaire et enthousiaste. Le projet va continuer dans la bonne direction :) !

Je remercie aussi mes anciens collègues et amis qui ont pris part à cette aventure, je pense notamment à **Hélène Babski**, **Amir Kadi** et plus particulièrement à **Audrey Astori** qui ont bien débroussaillé le projet RINF. Je remercie aussi mes étudiantes **Aurélia Alimi** et **Mégane Le Brech** que j'ai eu la chance d'encadrer, vous êtes formidables ! Merci aussi **Antoine Ta**, désolé d'avoir eu moins de temps pendant ma période de rédaction... hâte de refaire un resto !

Je remercie chaleureusement les membres de l'équipe du 7^{ème} étage de Roussy pour leur soutien et leur aide, plus particulièrement :

Je remercie les collègues de mon bureau qui ont malheureusement dû me supporter au quotidien, en particulier **Carine Lefevre** qui devait souvent rester stoïque si elle voulait passer une journée normale. Je la remercie aussi pour les découvertes musicales, bisous d'ailleurs à **Sasha** et à **Axel**. Je tiens à remercier **Alice Rousseau**, sa passion pour la musique classique et les BO de Disney ont participé quelque part à mon éveil musical. Je remercie **Cyrielle Richard** pour son soutien et sa patience, désolé de t'avoir enfermée quelques fois en partant le soir... Tu vas devoir embêter quelqu'un d'autre maintenant, quelle infortune... :D. Je remercie **Christophe Berger** pour cette année passée ensemble, nos discussions et nos petites sorties ! De même pour **Thomas Nivet**, je suis content de t'avoir rencontré, j'ai déjà hâte de venir te voir à Rennes. Merci **Krishshanthi Sinnadurai** pour cette dernière année, pour nos discussions, je suis content de t'avoir connue, même si tu voulais souvent me faire culpabiliser de continuer de fumer en cette fin de thèse :p.

J'ai une petite pensée pour le bureau d'à côté, on a tous commencé ensemble et on s'en est plutôt bien sorti je trouve. Merci **Godelieve Meunier**, tu es un peu notre madone à nous, toujours à relativiser et à vouloir faire sourire les gens. Merci **Pierre Montanari** et **Adrien Grenier**, toujours le mot pour faire rire, bravo pour votre thèse, c'était vraiment mérité :).

A ceux qui vont bientôt aussi soutenir... Merci **Fetta Mazed**, cette dernière année est passée bien vite, je suis sûr que tout se passera bien et que tu vas enfin bientôt en voir le bout, tu le mérites vraiment. Merci **Sabrina Bondu**, tu es grave trop forte dans ce que tu fais, merci d'avoir été là, merci aussi pour tes conseils de sorties concerts et de bars traditionnels irlandais qui étaient pile ce que je voulais :). Merci **Salomé Le goff** pour ton soutien, pour nos petites réunions potins, nos petits breaks du midi, essaie de moins revenir le week-end et de profiter un peu plus !

Je tiens à remercier **Maria-Lilia Brassart**, c'était une chance pour nous que tu aies rejoint l'équipe. Merci pour ton soutien, ton souci que les gens se sentent bien, de donner envie aux gens d'être satisfait des petites choses comme une manip qui a marché, ainsi que ta manière de vivre !

Merci **Ismael Boussaid** pour tes conseils et ton enthousiasme, j'essaierai de présenter mes datas en *violin plot* pour mes prochaines présentations ! Merci **Rudy Birsen** pour ton dynamisme, ta persévérance et tes petites blagues qui ne font pas toujours sourire. Bon courage pour la suite de ta thèse !

Merci aussi à **Justine Decroocq** d'avoir pris un peu la relève du labo, je croise les doigts pour que les manips de ta dernière année se passent bien !

Merci à **Meriem Ladli** et **Lamya Haddaoui**, pour lesquelles j'ai beaucoup d'admiration !

Merci **Laury Poulain**, ma Lolo ! Ces petits moments et nos discussions étaient importants, t'es géniale, la Suisse va être chouette, tu m'en diras des nouvelles !

J'ai une petite pensée pour **Emilie-Fleur Gautier** et **Sarah Ducamp**, merci d'avoir été là pendant mon Master et mon début de thèse, vous êtes géniales, j'ai passé de bons moments avec vous.

Je remercie également le reste de l'équipe située sur la péninsule du bâtiment Méchain :

Je tiens à remercier **Samia Oussous**, **Amandine Houvert** et **Zubaidan Tuerdi**, vous faites un beau petit groupe, c'est important. Merci pour nos petites discussions et pour les petits breaks !

Je remercie les chercheurs de l'équipes pour leurs précieux conseils sur le projet, notamment **Frédérique Verdier**, **Yael Zemati**, **Isabelle Dusanter**, **Evelyne Lauret**, **Michaela Fontenay**, **Olivier Kosmider**, **Didier Bouscary**, et **Patrick Mayeux**. Merci pour votre soutien et votre savoir-faire, que ce soit sur les méthyls, l'érythropoïèse murine, la culture liquide des cellules érythroïdes, les constructions de vecteurs lentiviraux, la cellule souche et j'en oublie sûrement d'autres...

Je remercie vraiment **Otilia De Oliveira** pour son aide sur le projet murin ainsi que **Didier Surdez** pour notre collaboration sur la CHIP.

Merci **Isabelle Godin** de m'avoir montré les premiers pas dans la recherche et de m'avoir fait découvrir l'hématopoïèse et l'embryologie, deux domaines qui te tiennent à cœur et qui, je dois dire, sont effectivement vraiment chouette.

Pendant ces trois années j'ai eu la chance de pouvoir participer à des associations telle que JeCCo. Quelque part, heureusement que vous existez. Je garderai toujours en souvenir les vacances au ski et quelques-unes de nos sorties. J'ai de belles pensées pour le bureau 2017 auquel j'ai participé et dont les membres comptent beaucoup pour moi. Je pense ainsi à **Armelle**, **Marion**, **Robin**, **Antonin**, **Gaby** et **Simon**. Merci aussi à ceux qui continuent de maintenir l'asso cette année : **Isabelle**, **Anaïs**, **Clara**,

Camille, Christophe et Michael. Merci aussi à **Cyril, Mariangela et Tanguy** que je suis content d'avoir rencontré.

Merci **Elodie Tepaz**, je suis vraiment ravi de t'avoir croisée, je t'envoie de gros bisous du courage pour ta rédaction de thèse qui va bien se passer :).

Un grand Merci à **Vincent Guichard**, mon petit canard, l'une des plus fortuites et heureuses rencontres de cette dernière année de thèse. Je te souhaite évidemment aussi du courage pour ta rédaction, j'ai encore du mal à comprendre comment c'est possible de s'y prendre autant à l'avance mais tu m'as montré que c'était visiblement possible ! Tu comptes pas mal pour moi, tu le sais déjà, à mon tour de t'attendre en bas de la piste de ski cette fois !

A mes autres amis, ceux qui ont un travail depuis quelques années, à qui je pense fort aussi d'ailleurs.
Bro' 4ever

A ma famille que j'aime, qui me motive et m'a permis d'arriver au bout de cette belle histoire. Je pense aussi à ma grand-mère qui a eu le temps de corriger ma thèse, vraiment balèse. À mon grand-père.

Le plus grand des MERCI revient sans vraiment de surprise à ma tendre petite chérie **Rozenn Riou**. Je ne me rends pas compte de la chance que j'ai de t'avoir rencontré, tu es extraordinaire, pleine de vie et d'envies. C'est grâce à toi que je suis arrivé au bout de ce voyage. Vivement en faire d'autres ensemble.

A la voile, la moto et l'escalade.

Petit bémol :

Aux anonymes heureux qui ont eu l'idée, pas comme moi, de rentrer leur Références au moment de l'écriture pour ne pas avoir à partir à la pêche aux mots clés pour trouver la bonne publi contre les 85 000 Zang qui ont publié en 2015. Je remercie Socolovsky d'avoir un nom permettant cette fois aisément de trouver ses articles, bien qu'il suffise cependant de bien savoir l'orthographe.

Je remercie www.sci-hub.io/.la/.cc/, plus récemment [.tw/](http://www.sci-hub.io/.tw/) et aux prochains de lutter au quotidien pour permettre l'accès gratuit à de nombreux articles scientifiques.



Nerophite

Liste des principales abréviations

ABD:	Anémie de Blackfan-Diamond
ADN:	Acide désoxyribonucléique
AGM:	Aorte, gonade, mésonéphros
AF:	Anémie de Fanconie
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
ATM:	<i>Ataxia Telangiectasia mutated protein-kinase</i>
ATRA:	<i>all-trans</i> retinoic acid
BFU-E:	<i>Burst forming unit-Erythroid</i>
BMP:	<i>Bone morphogenic protein</i>
CB:	<i>Cord-blood</i> (sang de cordon ombilicale)
CD:	<i>Cluster</i> de différenciation
CDK:	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
C/EBP α :	<i>CCAAT/enhancer-binding protein-α</i>
CFU-E:	<i>Colony Forming unit-Erythroid</i>
CLP:	Progéniteur lymphoïde commun
CMP:	Progéniteur myéloïde commun
CSH:	Cellule souche hématopoïétique
CSPH:	Cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques
CSM:	Cellule souche mésenchymateuse
DNMT:	ADN méthyltransférase
DVL:	<i>Dishevelled</i>
EMP:	Progéniteur érythro-mégakaryocytaire
EMT:	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
EPO:	Erythropoïétine
ERE:	<i>Estrogen responsive element</i>
ESC:	Cellules souches embryonnaires
Fc:	Fragment constant
FF:	Foie fetal
Fz:	<i>Frizzled</i>
G-CSF:	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF:	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GMP:	Progéniteur granulo-monocytaire
GSK3:	<i>Glycogensynthetase kinase</i>
HAT:	Histone acétyltransférase
HbF:	Hémoglobine fœtale
HDAC:	Histone désacétylase
HEK293:	<i>Human embryonic kidney 293</i>
ICAM:	Molécule d'adhésion intercellulaire
IMBFS:	<i>inherited bone marrow failure syndromes</i>
IL:	Interleukine
I-SMAD:	<i>Inhibitory-SMADs</i>
KLF4:	<i>Kruppel-like factor 4</i>
LAM:	Leucémie aiguë myéloïde
LIF:	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
Lin:	<i>Lineage</i>
LMC:	Leucémie myéloïde chronique
LTC-IC:	<i>Long-Term Culture-Initiating Cell</i>
LT-CSH:	Cellule souche hématopoïétique à long-terme
MH:	<i>Mad homology</i>

MAPK:	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MBD:	<i>Methyl binding protein</i>
MET:	<i>Mesenchymal to epithelial transition</i>
MGG:	May-Grünwald Giemsa
miR:	<i>microRNA</i>
MO:	Moelle osseuse
MPP:	Progéniteur multipotent
MOD1:	<i>myogenic identity factor myoblast determination protein-1</i>
NK:	<i>Natural Killer</i>
NLS:	<i>Nuclear localization sequence</i>
PB:	<i>Peripheral blood</i>
PI3K:	Phosphoinositide 3-kinase
RARE:	<i>Retinoic acid responsive element</i>
RINF:	<i>Retinoid-inducible nuclear factor</i>
SARA:	<i>Smad anchor for receptor activation</i>
SCF:	Stem cell factor
shARN:	<i>short hairpin RNA</i>
SMAD:	<i>Small mothers against decapentaplegic</i>
SMD:	Syndromes myélodysplasiques
ST-CSH:	Cellule souche hématopoïétique à court-terme
TEH:	Transition Endothélio-Hématopoïétique
TGF- β :	<i>Transforming growth factor-β</i>
Tmod3:	Tropomoduline-3
TPO :	Thrombopoïétine
TRIM33:	<i>Tripartite motif containing 33</i>
UTR:	<i>Untranslated Terminal Region</i>
ZEB1:	<i>zinc-finger E-box-binding homebox 1</i>
ZFP:	<i>Zinc finger protein</i>

Liste des figures

Figure 1: Une représentation schématique l'hématopoïèse humaine de l'adulte.	15
Tableau 1: Différents marqueurs de l'étude de la LT-CSH murine	17
Figure 2: Exemple de panels de marqueurs de surface utilisés pour l'analyse des HSPC humain et murin.	18
Figure 3: Un modèle alternatif de l'hématopoïèse.	20
Figure 4: Emergence et capacité des trois vagues d'hématopoïèse et les sites successivement colonisés au cours du développement embryonnaire de la souris.....	22
Figure 5: Les différents sites d'hématopoïèse au cours du développement embryonnaire et au long de la vie de l'homme.	22
Figure 6: Schéma des interactions avec les CSH dans la niche hématopoïétique.	24
Figure 7: Schéma des facteurs de transcription de l'heptade lié à l'ADN.....	26
Figure 8: Schéma de la différenciation érythroïde.	27
Figure 9: Photo macroscopique d'une BFU-E et d'une CFU-E observée en milieu semi-solide.	28
La Figure 10: Schéma (gauche) et image (droite) d'un îlot érythroblastique.	31
Figure 11: Distinctions morphologiques et expression de différents marqueurs de surface au cours de la différenciation érythroïde.	33
Figure 12: Schéma et rôle de la signalisation du récepteur à l'EPO.....	40
Figure 13: Schéma des partenaires de GATA1 minimum pour induire un fibroblaste en progéniteur érythroïdes.	42
Figure 14: Profils d'expression des facteurs de transcription GATA1 et GATA2 au cours de l'érythropoïèse.	44
Figure 15: Schéma récapitulatif de l'action de certains miRs dans la régulation de l'érythropoïèse.	46
Figure 16: Représentation schématique des deux complexes protéiques membranaires principaux de l'érythrocyte.	51
Figure 17: Schéma des différentes signalisations du TGF- β médiée par les SMADs.....	57
Figure 18: Effets du TGF- β sur la régulation de la croissance/prolifération et la maturation/différenciation lors du développement des cellules hématopoïétiques	64
Figure 19: Mise en évidence de l'effet du TGF- β au cours de l'érythropoïèse.	66
Figure 20: Représentation schématique de la localisation (A) et de la structure (B) du gène CXXC5, codant le facteur nucléaire RINF.	70
Figure 21: Le motif à doigt de zinc de type CXXC de la protéine RINF.	72
Figure 22: Classement des protéines à doigt de Zinc CXXC par leur motif d'affinité de liaison à l'ADN et par leur rôle.	73
Figure 23: Schéma du cycle de déméthylation active de l'ADN.	74
Figure 24: Expression de RINF dans différents tissus de l'organisme.	78
Figure 25: Schéma proposé du mécanisme d'action de RINF sur la voie Wnt/ β -caténine.....	80
Figure S1: Mise en évidence des effecteurs de la voie du TGF- β et de la phosphorylation de SMAD2 et de SMAD3 au cours de l'érythropoïèse.....	90
Figure S2: La perte de RINF sensibilise les progéniteurs érythroïdes au TGF- β 1 même à de très faibles doses.....	92
Figure S4: Mise en évidence du défaut de viabilité des souris homozygotes <i>Rinf</i> ^{-/-} et hétérozygotes <i>Rinf</i> ^{+/-}	97
Figure S5: Mise en évidence du défaut de fertilité des souris femelles <i>Rinf</i> ^{-/-} , homozygotes.	98
Figure S6: Mise en évidence du défaut de fertilité partiel des souris mâles <i>Rinf</i> ^{-/-} , homozygotes.	99
Figure S7: Expression de <i>Rinf/Cxhc5</i> lors de la myélopoïèse de souris adultes et lors du développement embryonnaire (dans le foie fœtal).....	100
Figure S8: Analyse de l'expression de l'ARNm de <i>Rinf</i> et de <i>Smad7</i> dans les progéniteurs hématopoïétiques murin triés par cytométrie en flux.	101
Figure S9: Analyses de l'expression ARN de <i>Rinf</i> et de <i>Smad7</i> dans la MO de souris WT, <i>Rinf</i> ^{+/-} et <i>Rinf</i> ^{-/-}	102
Figure S10: Analyse de la répartition des progéniteurs hématopoïétiques de la MO des souris <i>Rinf</i> ^{+/-} et <i>Rinf</i> ^{-/-}	104
Figure S11 : Schéma proposé du mécanisme d'interaction avec la voie de signalisation Wnt/ β -caténine.....	123

Sommaire

Liste des principales abréviations	5
Liste des figures	7
Sommaire	9
Résumé.....	12
Introduction.....	14
1. L'hématopoïèse	14
1.1. La cellule souche hématopoïétique (CSH).....	14
1.1.1. Généralités sur l'hématopoïèse.....	14
1.1.2. Méthodes d'étude de la CSH humaine et murine	16
1.1.3. Hiérarchie de différenciation des CSH.....	18
1.1.4. Vers une redéfinition du modèle de l'hématopoïèse	19
1.2. Développement du système hématopoïétique	21
1.2.1. Les étapes principales de l'hématopoïèse et ses différents sites de développement	21
1.3. Niche hématopoïétique et mécanismes de régulation par des facteurs extrinsèques (du microenvironnement).....	23
1.4. Régulation de l'hématopoïèse par des facteurs de transcriptions.....	25
2. L'érythropoïèse	27
2.1. Préambule et définition	27
2.2. L'érythropoïèse précoce, du stade BFU-E au stade de CFU-E	28
2.3. L'Erythropoïèse tardive: du stade CFU-E à l'érythrocyte, et l'îlot érythroblastique	30
2.3.1. Caractérisation de l'érythropoïèse tardive humaine	32
2.3.2. Caractérisation de l'érythropoïèse murine.....	32
2.4. Régulation de l'érythropoïèse au niveau moléculaire	34
2.5. La régulation de l'érythropoïèse par des cytokines	36
2.5.1. Cas du Stem Cell Factor et de l'Erythropoïétine	36
2.5.2. La voie des STATs.....	38
2.5.3. La voie PI3K/AKT.....	38
2.5.4. La voie des MAP Kinases.....	39
2.5.5. Coopération et synergie des récepteurs EPO-R et c-Kit-R	40
2.6. Régulation transcriptionnelle de l'érythropoïèse	42
2.6.1. GATA1 et ses partenaires	42
2.7. Les étapes de la différenciation érythroïde terminale	45
2.8. Les microARN au contrôle de l'érythropoïèse	45
2.8.1. Rôle de la régulation des caspases au cours de l'érythropoïèse terminale	47
2.8.2. Régulation positive de l'érythropoïèse.....	47
2.8.3. Régulation négative de l'érythropoïèse.....	47
2.8.4. Régulation de l'érythropoïèse par le métabolisme du Fer	48
2.9. L'érythropoïèse de stress	49
2.10. Erythropoïèse fœtale et érythropoïèse adulte	50
2.11. Composition membranaire et du cytosquelette de l'érythrocyte au cours de la maturation terminale	50
2.12. Les hémopathies	53
2.12.1. Exemple de la SMD 5q.....	54
3. La voie de signalisation du TGF-β.....	56
3.1. Description du mécanisme d'action <i>via</i> les récepteurs au TGF-β (TGF-βR)	57
3.2. Les protéines SMADs	58
3.2.1. Rôle du TGF-β dans la biogenèse des miRs	59
3.2.2. Rôle du TGF-β sur la chromatine.....	59
3.2.3. Exemple de TIF1γ.....	60
3.2.4. Rôle de TGF-β dans l'autorenouvellement et la différenciation des cellules ES.....	60
3.2.5. Rôle de TGF-β dans l'EMT et dans la reprogrammation des iPS.....	61
3.2.6. Rôle du TGF-β dans la réponse immunitaire	62
3.3. Rôle du TGF-β dans l'hématopoïèse	63
3.3.1. Rôle du TGF-β dans la balance quiescence versus autorenouvellement des CSH	63
3.3.2. Rôle de TGF-β dans l'engagement des progéniteurs hématopoïétiques	63
3.4. Rôle du TGF-β1 dans la différenciation érythroïde	65
3.5. Rôle des autres cytokines appartenant à la superfamille du TGF-β au cours de la différenciation érythroïde	67

3.5.1.	Cas de l'activine A, du BMP2 et du BMP4.....	67
3.5.2.	Cas de GDF11 et de GDF15.....	67
3.5.3.	Inhibiteurs des TGF- β R.....	68
4.	Etude du gène <i>CXXC5</i>, alias <i>RINF</i>.....	69
4.1.	Localisation chromosomique et structure du gène <i>CXXC5</i>	69
4.2.	Analyse de sa structure protéique primaire.....	70
4.3.	RINF, un probable régulateur épigénétique.....	71
4.3.1.	Un doigt de zinc pour les gouverner tous.....	71
4.4.	Expression du gène <i>CXXC5</i>	77
4.5.	<i>CXXC5</i> , également appelé RINF pour <i>retinoid inducible nuclear factor</i>	78
4.6.	RINF, un inhibiteur de la voie Wnt/ β -caténine.....	78
4.7.	RINF et voie de signalisation du TGF- β	81
4.7.1.	RINF est impliqué dans la reproduction.....	81
4.8.	L'ambiguïté de RINF avec les mécanismes d'apoptose.....	82
4.9.	<i>RINF</i> est dérégulé dans de nombreux cancers.....	83
	Justification du projet de recherche.....	85
	Résultats.....	86
	Article 1.....	87
	Résumé de l'article 1.....	88
	Données supplémentaires de l'article 1.....	90
	1. La perte de RINF sensibilise les progéniteurs érythroïdes à une sécrétion TGF- β autocrine, du moins en partie <i>via</i> la phosphorylation de SMAD2/3.....	90
	2. La perte de RINF au cours de la différenciation érythroïde impacte la production finale d'érythrocytes de façon dépendante du TGF- β	92
	3. <i>RINF</i> et <i>SMAD7</i> corrélient dans les CD34 de patients sains et les patients SMD 5q-.....	93
	Conclusion.....	94
	Partie 2.....	95
	Etude phénotypique d'un modèle murin invalidé pour <i>Rinf/Cxxc5</i>	95
	1. Les souris <i>Rinf</i> ^{-/-} sont partiellement viables.....	96
	2. Les souris <i>Rinf</i> ^{-/-} sont peu fertiles.....	98
	3. <i>Rinf</i> ne semble pas être exprimé dans l'érythropoïèse murine.....	100
	4. <i>Rinf</i> est exprimé dans les progéniteurs les plus immatures et son expression corrèle avec <i>Smad7</i> dans les souris WT. 101	101
	5. L'expression de <i>Smad7</i> est diminuée dans la moelle osseuse totale des souris <i>Rinf</i> ^{+/-} et <i>Rinf</i> ^{-/-}	102
	6. Analyse des progéniteurs hématopoïétiques des souris <i>Rinf</i> ^{-/-}	103
	Discussion et perspectives.....	106
	Partie 1 Erythropoïèse humaine.....	106
	1. Impact de RINF dans l'érythropoïèse normale.....	106
	RINF interfère avec l'érythropoïèse.....	106
	Mise en évidence de SMAD7 de la signalisation du TGF- β dans l'érythropoïèse.....	108
	2. Contribution éventuelle de RINF dans les hémopathies.....	112
	Partie 2 Invalidation de <i>Rinf</i> chez la souris.....	113
	1. impact de la perte de <i>Rinf</i> dans le modèle murin <i>Rinf</i> ^{-/-}	113
	Les souris <i>Rinf</i> ^{-/-} sont peu viables.....	113
	Les souris <i>Rinf</i> ^{-/-} sont peu fertiles.....	114
	2. Impact de la perte de <i>Rinf</i> dans l'hématopoïèse murine.....	115
	3. Y a-t-il une perte de <i>Smad7</i> dans d'autres tissus (non hématopoïétiques) ?.....	117
	Discussion générale.....	118
	1. Compte-tenu de son rôle de modulateur du TGF- β , RINF pourrait impacter d'autres lignages hématopoïétiques que le lignage érythroïde.....	118
	La perte de RINF joue-t-elle un rôle dans des conditions d'érythropoïèse de stress ?.....	119
	2. RINF un régulateur épigénétique probable.....	120
	3. Implication de RINF dans les cancers.....	121
	4. RINF et mécanisme d'action général.....	121
	Annexes.....	124
	Article 1.....	125
	Figures supplémentaires.....	157
	Bibliographie.....	172

Résumé

Les érythrocytes (globules rouges, GR) transportent le dioxygène (*via* l'hémoglobine) des poumons aux tissus de l'organisme. Leur production est assurée par des cellules souches hématopoïétiques (CSH), garantes des cellules constituant le sang. Chez l'adulte, l'érythropoïèse (processus qui aboutit à la production d'érythrocytes) a lieu en continu dans la moelle osseuse pour produire au quotidien environ 10^{11} érythrocytes. C'est de loin le plus haut rendement de production cellulaire du corps humain. Ce processus est finement régulé par une balance prolifération *versus* différenciation et peut s'adapter aux besoins de l'organisme. Cependant, le moindre défaut de régulation peut aboutir progressivement à des désordres érythroïdes (anémies, polyglobulies, voire à des transformations leucémiques).

Le gène *CXXC5* (alias *RINF*, *Retinoid-Inducible Nuclear Factor*), a été découvert en 2009 comme une cible directe des rétinoïdes nécessaire à la granulopoïèse. En effet, des expériences d'inactivation par ARN interférence ont démontré que l'expression de ce facteur était essentielle à la différenciation granulocytaire terminale des cellules hématopoïétiques aussi bien normales (progéniteurs hématopoïétiques humains $CD34^+$ cultivés en présence de G-CSF) que leucémiques (lignée NB4 traitée par l'ATRA, Acide Rétinoïque tout-*trans*). Ce gène est localisé en 5q31, une région fréquemment sujette à des délétions chromosomiques dans des hémopathies malignes. Il code un facteur chromatinien possédant un motif à doigt de Zinc de type CXXC, retrouvé conservé avec plusieurs modulateurs épigénétiques importants. Toutefois, la contribution fonctionnelle de *RINF* sur la maturation ou l'engagement des progéniteurs vers d'autres lignages hématopoïétiques, n'avait pas été déterminée.

Mes travaux de thèse ont démontré l'implication de *RINF* dans l'érythropoïèse humaine par l'intermédiaire d'expériences de pertes et gains de fonction dans des progéniteurs hématopoïétiques $CD34^+$ (de sang de cordon ombilical ou de moelle osseuse) cultivés en présence d'EPO. Nous avons identifié le mécanisme d'action moléculaire et démontré que *SMAD7* (un gène codant un inhibiteur de la voie de signalisation du TGF- β) était une cible transcriptionnelle directe de *RINF* (mis en évidence par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine, cette cible a été validée sur des cellules primaires et dans deux lignées érythroleucémiques K562 et UT7). Nous avons également montré que ce mécanisme d'action est dépendant du TGF- β (par l'utilisation d'un inhibiteur du TGF- β RI sur des cellules primaires en culture). Ainsi, la perte d'expression du gène *RINF/CXXC5* au cours de l'érythropoïèse sensibilise les érythroblastes au TGF- β et conduit à une production d'érythrocytes plus restreinte (et contribuerait ainsi *in vivo* à la cytopénie du lignage érythroïde).

Enfin, la caractérisation phénotypique du modèle murin génétiquement invalidé pour le gène *Rinf* a été initiée. Mes travaux ont notamment mis en évidence une perte importante de viabilité et de fertilité des souris *Rinf*^{-/-}. L'hématopoïèse murine a aussi été explorée. Les résultats préliminaires nous laissent penser que la régulation de *Smad7* par le facteur *RINF* (mise en évidence dans l'érythropoïèse humaine) s'exerce aussi dans le tissu hématopoïétique murin.

Ce facteur épigénétique pourrait jouer un rôle important en modulant (1) les capacités d'expansion et d'auto-renouvellement des progéniteurs hématopoïétiques, (2) leur sensibilité au TGF- β (*via Smad7*) et/ou (3) les processus d'hydroxyméthylation de l'ADN génomique.

Introduction

1. L'hématopoïèse

1.1. La cellule souche hématopoïétique (CSH)

1.1.1. Généralités sur l'hématopoïèse

Chez les mammifères adultes, les cellules du sang sont générées en permanence dans la moelle osseuse (MO). Cette production assure le maintien quotidien et tout au long de la vie, du très grand nombre de cellules dont l'organisme a besoin. Ce processus constant de production est assuré par une rare population de cellules immatures, les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques (CSPH). Parmi celles-ci, les CSH (cellules souches hématopoïétiques) se définissent comme des progéniteurs multipotents (c'est-à-dire, capables de produire plusieurs types de cellules sanguines) qui, au cours des étapes de prolifération et de différenciation successives perdent progressivement leur potentiel à générer plusieurs lignages jusqu'à devenir unipotents. Cette différenciation progressive, appelée hématopoïèse, aboutit à l'obtention de tous les constituants cellulaires du sang comprenant les érythrocytes (globules rouges ou GR), les mégacaryocytes, les cellules myéloïdes (monocytes/macrophages et granulocytes), les cellules dendritiques (CD), les lymphocytes B et T et les Natural Killer (NK) (Orkin 2000) (Weissman 2000).

Des expériences *in vivo* de régénération du système hématopoïétique ont montré que seules les CSH étaient capables, sur le long terme, de générer tous les éléments figurés du sang. De ces expériences en sont ressorties deux propriétés fondamentales de ces CSH: L'autorenouvellement et la multipotence (Osawa et al. 1996) (Wagers et al. 2002) (Ema et al. 2005) (Hock 2010).

La capacité d'autorenouvellement se définit par la capacité de ces cellules à maintenir un *pool* de CSH indifférenciées *via* une **division symétrique** de ces cellules (qui conserve les propriétés initiales de la CSH mère). La CSH peut également effectuer une **division asymétrique** pour s'engager dans un lignage hématopoïétique. Une des deux cellules filles perd alors sa capacité d'autorenouvellement. Ainsi, les transplantations de CSH d'un individu à un hôte préalablement irradié ont montré qu'une seule CSH était capable de régénérer le système hématopoïétique d'un individu (Smith, Weissman, et Heimfeld 1991) (Osawa et al. 1996).

La multipotence est, quant à elle, décrite comme la capacité à produire plusieurs types de cellules (sanguines). En somme, tous les lignages hématopoïétiques du sang proviennent d'une CSH commune. C'est la raison pour laquelle l'hématopoïèse est souvent représentée en une structure hiérarchique pyramidale au sommet duquel trône la CSH (**Figure 1**).

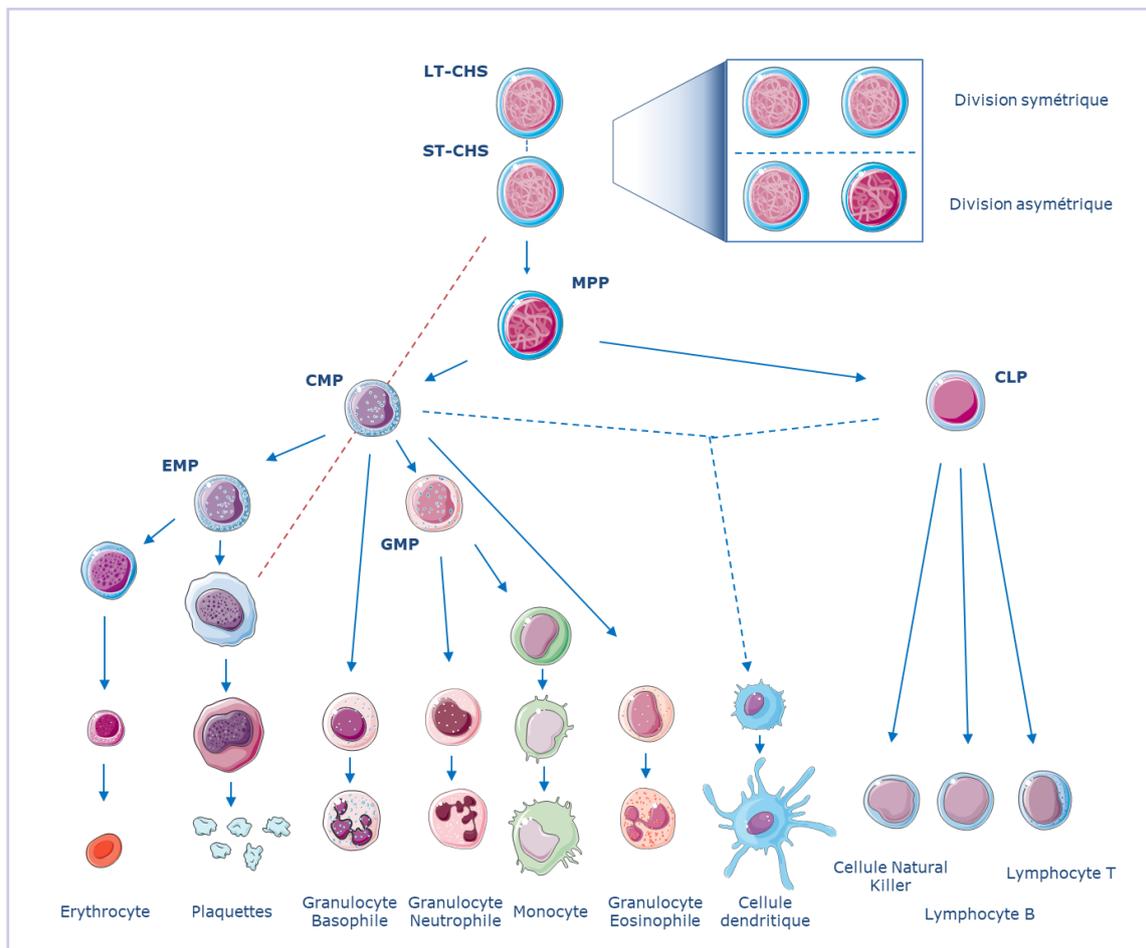


Figure 1: Une représentation schématique l'hématopoïèse humaine de l'adulte. Abréviations: Cellule souche hématopoïétique à long-terme (**LT-CSH**), Cellule souche hématopoïétique à court-terme (**ST-CSH**), Progéniteur Multipotent (**MPP**), Progéniteur Myéloïde Commun (**CMP**), Progéniteur Erythro-Mégakaryocytaire (**EMP**), Progéniteur Granulo-Monocytaire (**GMP**), Progéniteur Lymphoïde Commun (**CLP**). *Adapté de Larsson et al. 2005, Notta et al. 2016, Tusi 2018, Blank et Karlsson 2015.*

Lors de divisions asymétriques, la CSH perd petit à petit sa capacité d'autorenouveau, c'est-à-dire sa capacité de maintien du nombre de CSH. Il est ainsi possible de discriminer les CSH à court terme, ST-CSH (*short-term hematopoietic stem cell*) des CSH à long terme (LT-CSH), capables de se greffer et de maintenir une hématopoïèse humaine chez la souris plus de 12 semaines après transplantation (Benveniste et al. 2010).

1.1.2. Méthodes d'étude de la CSH humaine et murine

Les progrès dans l'étude de la caractérisation phénotypique et fonctionnelle des CSH et autres précurseurs ont fait du système hématopoïétique un paradigme de la biologie des cellules souches (Orkin et Zon 2008) (Rowe et al. 2016). Ces avancées ont essentiellement débuté par l'étude du modèle murin (Till et McCulloch 1961) dont l'hématopoïèse s'est avérée très proche de l'hématopoïèse humaine bien que les marqueurs de surface utilisés pour la caractérisation des progéniteurs soient sensiblement différents.

La CSH étant assez rare, 50.000 à 200.000 CSH chez l'homme (Lee-Six et al. 2018) contre 17.000 chez la souris (LT-CSH) (Busch et al. 2015). La cytométrie en flux (*Fluorescent Activated Cell Sorting*), une technique basée sur la reconnaissance de marqueurs de surface membranaire propres à ces cellules permet d'isoler des populations enrichies en CSH. Il faut cependant garder à l'esprit que seule une expérience fonctionnelle permet de caractériser une CSH, où l'on peut mettre en évidence ses propriétés qui la définissent ; **sa capacité d'autorenouveau et de multipotence**. Ainsi, les véritables CSH sont capables de proliférer en culture en absence de facteur de croissance sur une couche de cellules stromales, ou de **reconstituer une hématopoïèse humaine chez la souris irradiée**. Cette dernière propriété est appelée la méthode LTR (*long-term reconstitution*). De nos jours cette technique est la plus fiable et permet d'identifier une CSH ainsi que d'étudier sa capacité de multipotence et d'autorenouveau.

Historiquement, les marqueurs de surface utilisés pour l'étude de la CSH humaine étaient le CD34 (CD pour cluster de différenciation) (Bhatia et al. 1997) et l'absence de marqueur de surface CD38 (exprimé chez certaines cellules immunitaires) ainsi que l'absence de marqueur de surface d'engagement hématopoïétique (appelé lin- pour *lineage negative*) tel que le CD235A (appelé aussi GPA pour glycophorine A) et le CD233 (appelé aussi band3),

caractéristiques des cellules érythroïdes, le CD3, CD19, CD8 pour les cellules lymphoïdes et le CD14, CD15 et le CD33 pour le lignage myéloïde. Toutefois, les cellules triées de la sorte sont encore hétérogènes et partagent des mêmes marqueurs de surface avec d'autres progéniteurs hématopoïétiques et les prises de greffe ne dépassent pas 1% chez la souris. Plus récemment, l'identification d'autres marqueurs tels que l'exclusion du CD45RA, la présence du CD49f et du CD90 ont permis de mieux distinguer ces CSH (Notta et al. 2011) permettant leur étude *in vivo* et *in vitro*.

Les cellules souches hématopoïétiques murines sont appelées LSK (Lin⁻, Sca-1⁺, c-Kit⁺), Lin pour *Lineage negative* (même principe de discrimination des lignages hématopoïétiques humains dont les marqueurs sont par exemple le Gr1, marqueur des granulocytes, CD19 et B220 marqueur des cellules lymphocytes B, CD3 marqueurs des lymphocytes T ou le ter119 marqueur des cellules érythroïdes) (Adolfsson et al. 2001) (Kiel et al. 2005). Les études fonctionnelles des LSK ont été plus facilement réalisées chez la souris du fait que la capacité de reconstitution du système hématopoïétique après greffe de CSH entre souris (allogreffe) est plus persistante qu'avec un greffon humain transplanté chez une souris préalablement irradiée (xénogreffe).

La distinction LT-CSH/ST-CSH murines peut se faire en ajoutant le marqueur CD150 (marqueur SLAM) (Tornack et al. 2017), le marqueur CD34 (Osawa et al. 1996), les marqueurs Flk-2/Flt3/CD135 (Christensen et Weissman 2001) (Yang et al. 2005). Ainsi, les LT-CSH murines sont capables de se maintenir et de renouveler le système hématopoïétique tout au long de la vie de la souris greffée et peuvent même être regreffées successivement dans une autre souris receveuse. Les différents marqueurs de surface des progéniteurs hématopoïétiques murins sont regroupés dans le **tableau 1** ci-dessous.

Phénotype des marqueurs de surface	Type Cellulaire	Référence
SP ^{KLS}	LT-CSH	Goodell et al. (1996)
Flk2 ⁻ CD34 ⁻ KLS	LT-CSH	Adolfsson et al. (2001)
CD150 ⁺ CD48 ⁻ CD244 ⁻	LT-CSH	Kiel et al. (2005)
CD150 ⁺ CD48 ⁻ CD34 ⁻ KLS	LT-CSH	Wilson et al. (2007)

Tableau 1: Différents marqueurs de l'étude de la LT-CSH murine

1.1.3. Hiérarchie de différenciation des CSH

Les ST-CSH progressent en progéniteurs multipotents appelés MPP (*Multipotent Progenitor*), qui ont un haut potentiel de prolifération mais qui n'ont plus la capacité de s'autorenouveler à l'identique comme les CSH. De récentes preuves expérimentales ont montré que la population de MPP est une population encore hétérogène: bien que multipotente, une fraction de ces MPP serait déjà engagée vers une voie de différenciation préétablie (myéloïde ou lymphoïde). Il est suggéré que les différents MPP sont produits par différenciation des ST-CSH suivant le besoin hématopoïétique (Pietras et al. 2015). Le MPP peut ensuite s'engager dans le lignage myéloïde en générant un Progéniteur Myéloïde Commun (CMP) ou dans le lignage Lymphoïde en générant un Progéniteur Lymphoïde Commun (CLP). Ensemble, ces deux progéniteurs peuvent générer toutes les cellules matures du système hématopoïétique. Le CMP engendre des progéniteurs érythro-mégakaryocytaire (EMP) capables de s'orienter dans le lignage érythroïde ou mégacaryocytaire, les progéniteurs Granulo-monocytaires (GMP) sont capables de s'orienter dans le lignage granulocytaire et/ou monocytaire.

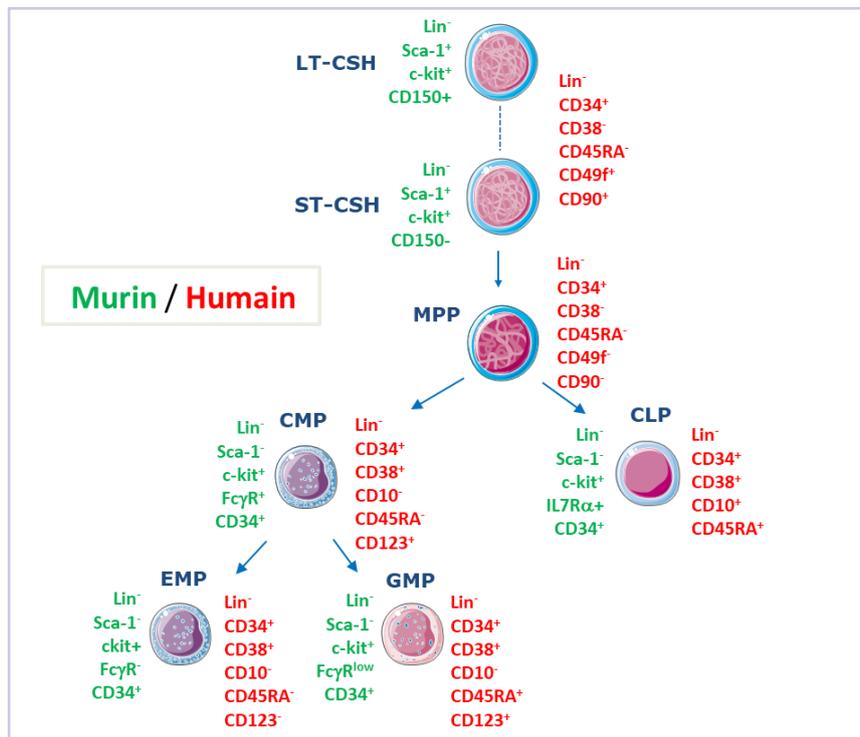


Figure 2: Exemple de panels de marqueurs de surface utilisés pour l'analyse des HSPC humain et murin.

1.1.4. Vers une redéfinition du modèle de l'hématopoïèse

Des découvertes récentes suggèrent que la représentation conventionnelle exposée en **Figure 1** serait moins strictement compartimentée qu'on ne le pensait. Ainsi, et de manière intéressante, on observe que les cellules dendritiques peuvent dériver aussi bien d'un GMP que d'un CLP (Geissmann et al. 2010). Tout comme les mégacaryocytes qui pourraient également dériver directement d'un progéniteur mégakaryoblastique unipotent dont le profil d'expression génique serait semblable à celui des CSH (Yamamoto et al. 2013) (Haas et al. 2015) (Notta et al. 2016).

Le seul traitement efficace à l'heure actuelle pour de nombreuses maladies congénitales et acquises liées au sang est **la greffe de cellules souches hématopoïétiques**. Ce besoin a poussé la recherche à étudier la CSH dans le but de déterminer si des facteurs clés de régulation de ces cellules permettraient de les reprogrammer et ainsi agir sur les propriétés de la cellule souche (multipotence et autorenouvellement). Les travaux de **Takahashi** sur les IPSC (*Induced Pluripotent Stem Cells*) (K. Takahashi et Yamanaka 2006) puis notamment ceux de Kim (Kim et al. 2011) sur la reprogrammation des progéniteurs ont ouvert de nouveaux champs d'actions et de connaissances sur la plasticité cellulaire. Il semblerait que le schéma de hiérarchie de l'hématopoïèse le plus proche de la réalité serait davantage ressemblant à un modèle où de la CSH à la cellule hématopoïétique mature, les progéniteurs seraient dans un état transitoire, non stable, acquérant graduellement le phénotype d'engagement hématopoïétique d'un lignage donné. De ces observations, le modèle de Waddington (**Figure 3**) propose une représentation de cette hiérarchie *via* une représentation d'un paysage dynamique dans lequel la différenciation hématopoïétique serait favorisée vers un lignage donné pour subvenir à des besoins spécifiques de l'organisme selon le besoin (stress cellulaire, infections, anémie...). (Pina et al. 2012) (Macaulay et al. 2016) (Pour revue (Haas, Trumpp, et Milsom 2018)) (Tusi et al. 2018).

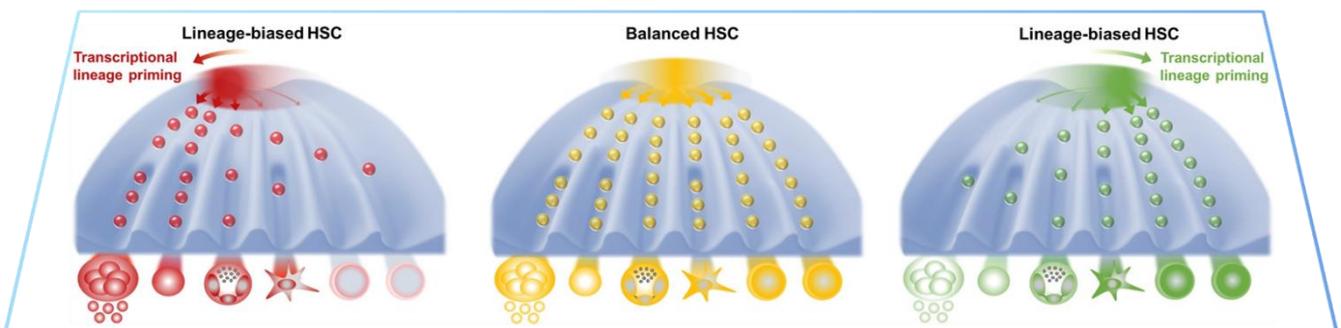
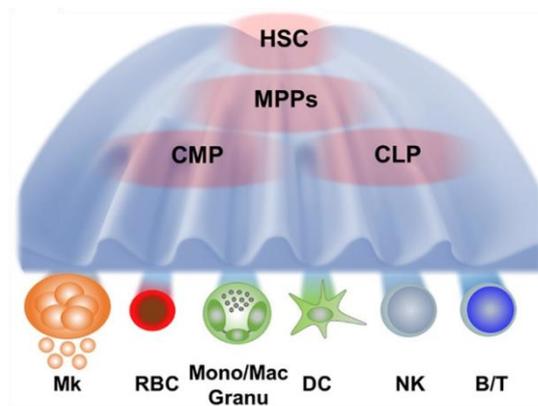


Figure 3: Un modèle alternatif de l'hématopoïèse. Représentation schématique d'un modèle d'hématopoïèse continu, dérivé du modèle de Waddington. Les CSH ne passeraient pas par des états intermédiaires stables (MPP, CMP, CLP...) mais acquerraient des caractéristiques spécifiques des lignages de façon continue. Dans un tel modèle, les stades de développement en aval des CSH, tels que les MPP ou les CMP, ne représentent pas des types de cellules distincts, mais devraient plutôt être considérés comme des états transitoires dans le continuum des CSH. *adapté de (Haas, Trumpp, et Milsom 2018)*

1.2. Développement du système hématopoïétique

1.2.1. Les étapes principales de l'hématopoïèse et ses différents sites de développement

Aussi bien chez la souris que chez l'homme, l'hématopoïèse se déroule en trois vagues successives au cours desquelles, le foie fœtal (FF), le thymus et enfin la moelle osseuse (MO) sont séquentiellement colonisés par la mise en place du système vasculaire (Cumano et Godin 2007). Les deux premières vagues génèrent des progéniteurs aux capacités de différenciation et de maintien limité, permettant dans un premier temps de fournir rapidement des cellules matures pour subvenir aux besoins immédiats de l'embryon. C'est lors de la dernière vague d'hématopoïèse qu'apparaissent les premières CSH capables de maintenir une hématopoïèse soutenue sur le long terme.

La première vague d'hématopoïèse est appelée hématopoïèse « primitive », elle est générée dans le sac vitellin (SV) sous forme d'îlots sanguins à partir d'un tissu partageant des caractéristiques communes entre les cellules hématopoïétiques et des cellules endothéliales. Ces premières cellules hématopoïétiques sont essentiellement des progéniteurs à potentiel érythroïde, myéloïde et mégacaryocytaire et ne produisent pas de cellules lymphoïdes ni de cellules partageant des caractéristiques communes aux CSH (James Palis 2014). La seconde vague d'hématopoïèse possède un potentiel intermédiaire et est composée de EMP (McGrath, Frame, et Palis 2015).

C'est au niveau de l'AGM (organe en développement composé de l'association de l'aorte, des gonades et du mésonéphros) que la dernière vague d'hématopoïèse a lieu. Elle est appelée hématopoïèse définitive, car c'est le siège d'apparition des CSH. Celles-ci sont formées au niveau du plancher aortique (Cumano et Godin 2007) et au niveau d'autres vaisseaux artériels embryonnaires. Cette formation longtemps sujette à débat a été démontrée par les travaux de Jaffredo *et al.* qui mettent en évidence dans l'embryon de poulet que la CSH est produite par transition d'une cellule endothéliale du plancher aortique en cellule hématopoïétique (Jaffredo et al. 1998). Cette transition est appelée Transition Endothélio-Hématopoïétique (TEH).

La mise en place de la circulation sanguine libère une pression telle que ces CSH bourgeonnantes sont décollées du plancher aortique, propulsées dans la circulation vasculaire et vont coloniser d'autres organes tels que le FF ou le thymus. C'est dans le FF (ainsi que le

placenta humain) qu'a lieu l'expansion des CSH permettant d'assurer l'hématopoïèse définitive (après colonisation de la MO) (**Figure 4**).

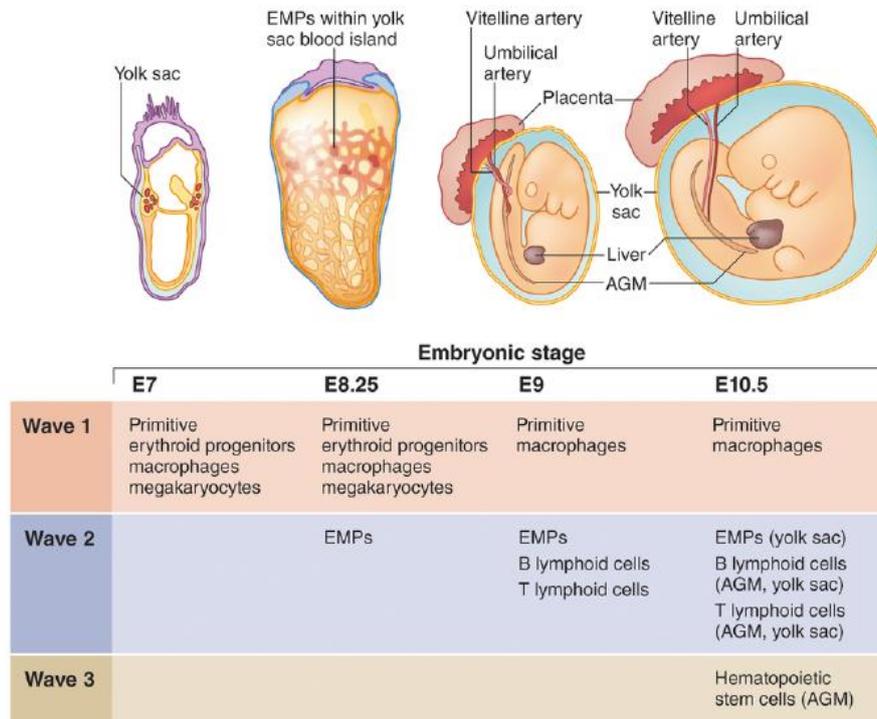


Figure 4: Emergence et capacité des trois vagues d'hématopoïèse et les sites successivement colonisés au cours du développement embryonnaire de la souris (D'après (Yoder 2014))

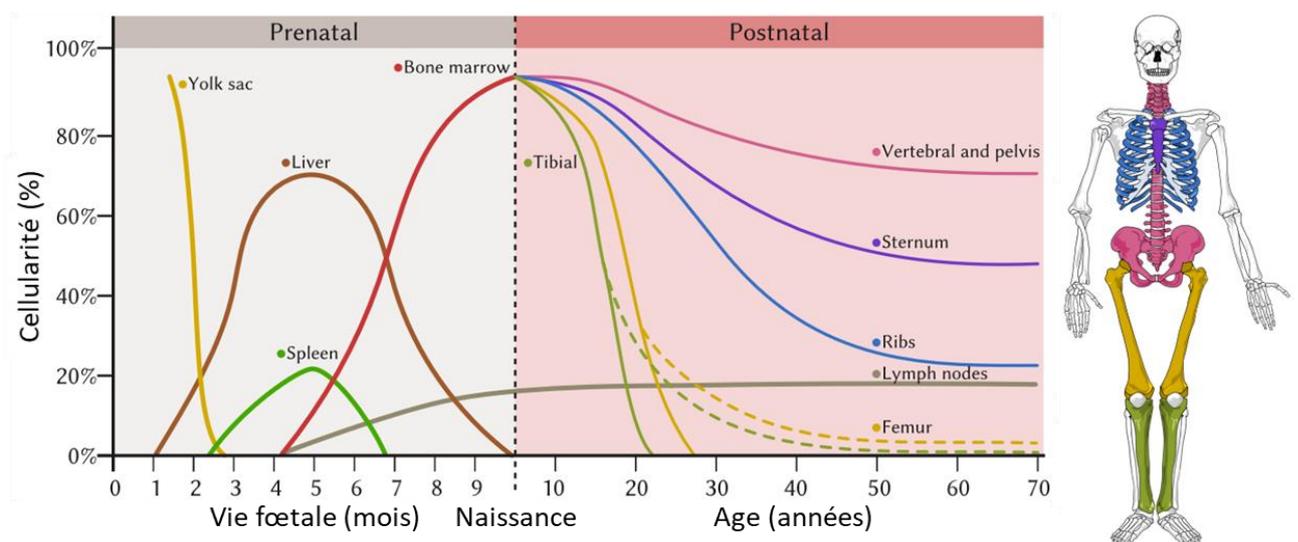


Figure 5: Les différents sites d'hématopoïèse au cours du développement embryonnaire et au long de la vie de l'homme. D'après Michal Komorniczak, medical illustrations

1.3. Niche hématopoïétique et mécanismes de régulation par des facteurs extrinsèques (du microenvironnement)

La MO est le siège de l'hématopoïèse adulte et est considérée comme la « niche » des CSH. Ce terme a été décrit en 1978 comme un microenvironnement spécialisé permettant de préserver les propriétés de la CSH (propriété de maintien seulement) (Schofield 1978). Depuis, les recherches sur l'environnement médullaire ont montré que les CSH étaient régulées notamment par des chimioquines, cytokines, hormones, vitamines et interactions cellulaires présentes dans la cavité osseuse.

Ces CSH sont régulées par nombre de cellules coexistantes dans la niche hématopoïétique, telles que les Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM), progéniteurs capables de se différencier en ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes et cellules stromales (Frenette et al. 2013). Ces cellules apportent de nombreux facteurs indispensables à la survie, prolifération, maintien, rétention et différenciation des CSH tels que le *Stem Cell Factor* (SCF) et le chimio-attractant CXCL12 (Calvi et al. 2003) (Sugiyama et al. 2006) (Ding et al. 2012) (Greenbaum et al. 2013).

Au sein de cette niche, des cellules hématopoïétiques prennent également en charge la régulation des CSH comme les mégacaryocytes, macrophages et lymphocytes T cytotoxiques. Par exemple, les mégacaryocytes seraient en partie responsables du contrôle de la quiescence des CSH *via* la sécrétion de CXCL4 (Bruns et al. 2014) et la production de TGF- β 1 (Meng Z et al, 2014) (détaillé dans la partie TGF- β et CSH).

Les LT cytotoxiques peuvent produire de l'interféron gamma (IFN γ) en cas d'attaque du système immunitaire, permettant aux CSM de sécréter à leur tour de l'IL6 induisant les CSH dans la différenciation myéloïde par répression de RUNX1 et de CEBP α (Schürch, Riether, et Ochsenbein 2014).

Les macrophages (CD169⁺) ont aussi un rôle vital au sein de la niche. En plus de participer à la différenciation érythroïde terminale (voir partie îlot érythroblastique, **page 27**) ils participent aux capacités de maintien des CSH à long terme (Kaur et al. 2018).

En plus de la coopération des cellules du système hématopoïétique et des CSM, le système nerveux central (CNS) a aussi un rôle dans le maintien de la niche hématopoïétique.

Les nerfs synaptiques établissent des connexions avec les CSH et secrètent avec un rythme circadien (dépendant du cycle de la journée) de la noradrénaline et de la norépinéphrine permettant de contrôler la production de CXCL12 et ainsi participer au maintien des CSH (Méndez-Ferrer et al. 2008) (Méndez-Ferrer et al. 2010).

Les hormones telles que les œstrogènes peuvent également affecter la CSH. La CSH exprime le Récepteur aux Estrogènes (ER α), ayant un impact positif sur l'auto-renouvellement des CSH et l'érythropoïèse notamment pendant la période de grossesse (Nakada et al. 2014) (pour revue (Heo et al. 2015)).

Pour finir, des vitamines ou dérivés des vitamines tels que l'acide rétinoïque (dérivé actif de la vitamine A) ont également un rôle sur la CSH. Dans une étude récente, l'acide rétinoïque a un effet de maintien du *pool* de CSH, en induisant leur quiescence (Cabezas-Wallscheid et al. 2017). De même, la vitamine C régulerait la capacité des HSC/MPP par un effet similaire (Agathocleous et al. 2017) (Cimmino et al. 2017).

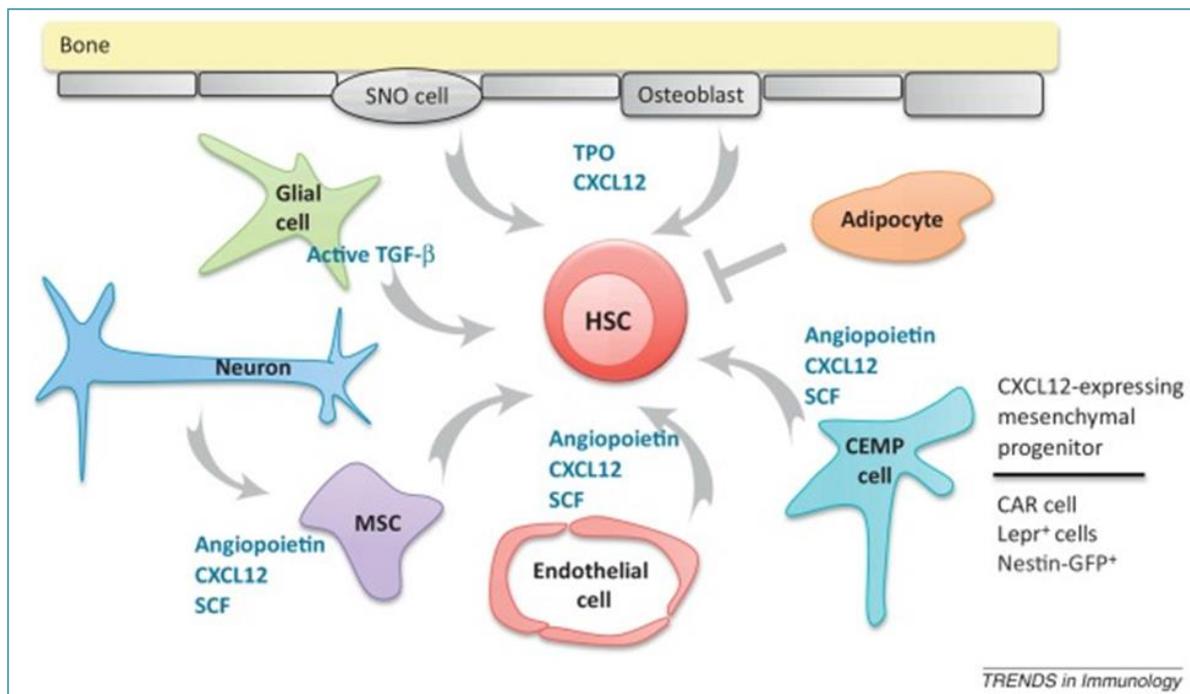


Figure 6: Schéma des interactions avec les CSH dans la niche hématopoïétique.

1.4. Régulation de l'hématopoïèse par des facteurs de transcriptions

Le maintien du *pool* de CSH, est finement régulé par un subtil équilibre entre prolifération, quiescence et différenciation. Il est orchestré par un réseau de facteurs de transcription comprenant des gènes essentiels au développement du système hématopoïétique. Les facteurs de transcription les plus importants permettant l'hématopoïèse primitive (mais aussi le développement du mésoderme et des cellules endothéliales) sont *Stem Cell Leukemia/T-ALL 1* (SCL/TAL-1), *LIM domain only 2* (LMO2) et *Friend leukemia integration 1* (FLI1/ERG). Les souris génétiquement invalidées pour ces gènes provoquent une létalité embryonnaire due à une absence complète de cellule hématopoïétique et également des défauts de formation de cellules endothéliales montrant ainsi une connexion proche entre ces deux tissus (Shivdasani, Mayer, et Orkin 1995) (N. K. Wilson et al. 2009) (Landry et al. 2009).

Deux facteurs de transcription responsables de la génération et du maintien de l'hématopoïèse définitive sont les deux facteurs de transcription *Runt-Related Transcription Factor 1* (RUNX1), et GATA2. Chez la souris, la délétion d'un de ces deux gènes entraîne une mort embryonnaire, sans apparition de CSH et avec un FF sévèrement anémique à E12.5 et E10.5 respectivement, alors que la biopsie de ces souris révèle que la vasculogénèse et l'hématopoïèse primitive s'établissent normalement (Tsai et al. 1994) (Q. Wang et al. 1996).

GATA2 semble un facteur primordial à la CSH puisque son invalidation conditionnelle, tissu spécifique chez la souris (grâce à un promoteur *Vav* exprimé dans les cellules hématopoïétiques et un autre promoteur *Vec* pour *Vascular Endothelial Cadherin*, exprimé uniquement dans les cellules endothéliales) a montré que GATA2 n'était pas seulement nécessaire pour la TEH et la génération de CSH mais aussi indispensable pour le maintien de la CSH elle-même, au cours de la vie d'un être vivant (de Pater et al. 2013). D'autres travaux ont également souligné l'importance cette fois de l'expression de GATA2, dont l'haplo-insuffisance et la surexpression abrogeaient les principales fonctions de la CSH (Ling et al. 2004) (Guiu et al. 2013).

La combinaison des analyses fonctionnelles de ces facteurs de transcription et certaines technologies telles que l'immunoprécipitation de la chromatine ChIP combinée au *whole-genome sequencing* (ChIP-seq), ont montré une interaction entre l'heptade de facteur de transcription: SCL, *Lymphoblastic leukemia-1* (LYL1), LMO2, GATA2, RUNX1, ERG et FLI1

ainsi que la mise en évidence d'un complexe protéique entre 4 facteurs clés GATA2, RUNX1, SCL et ERG capables de se lier à l'ADN (Nicola K. Wilson et al. 2010) (**Figure 7**).

Les travaux de Wilson et les techniques modernes de ChIP-seq ont apporté de nouvelles connaissances sur la régulation de l'hématopoïèse par les facteurs de transcription, comme leur régulation par les *enhancers* (régions régulatrices de la transcription qui peuvent être situées à distance des promoteurs des gènes et du site d'initiation de la transcription), mais également par l'intervention d'enzymes et protéines de modulation de la chromatine (Goode et al. 2016).

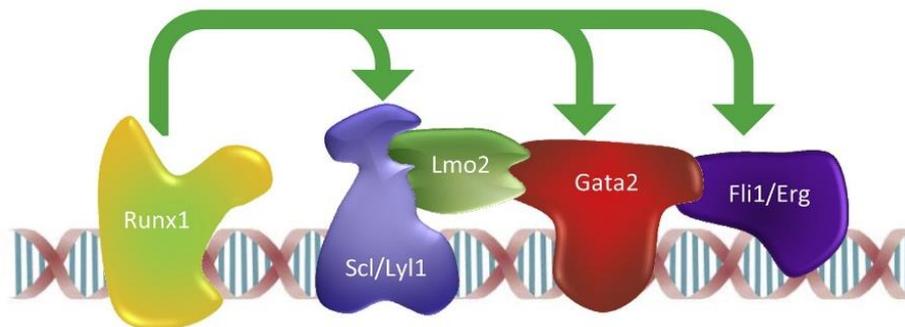


Figure 7: Schéma des facteurs de transcription de l'heptade lié à l'ADN

Le schéma représentatif de l'heptade Runx1, Scl, Lyl1, Lmo2, Gata2, Fli1, Erg. D'après (Wilson et al. 2010)

D'autres facteurs de transcription ne faisant pas partie de l'heptade ont aussi paru comme nécessaire à l'hématopoïèse, tout comme HOXB4 (Antonchuk, et Humphries 2002) et BMI1 (Rizo et al. 2008). Les études portées sur ces protéines ont révélé leur importance en tant que régulateurs positifs de l'autorenouvellement des CSH.

2. L'érythropoïèse

2.1. Préambule et définition

L'érythropoïèse est finement régulée par un processus de prolifération et celui de la différenciation (deux processus conjoints). Elle débute au stade du progéniteur érythroïde le plus immature (le EMP) et aboutit à la production d'érythrocytes (globules rouges, GR). Le rôle principal des érythrocytes est le transport du dioxygène (*via* l'hémoglobine) des poumons aux tissus de l'organisme. Le globule rouge constitue 99% des cellules des vaisseaux sanguins et **80% des cellules totales de l'organisme**. Environ, $2,5 \cdot 10^{13}$ globules rouges sont nécessaires pour assurer l'oxygénation constante des tissus. Malgré une longue demi-vie (100 à 120 jours), 1% de GR ont besoin d'être renouvelés chaque jour. Ainsi, l'érythropoïèse a lieu en continu pour produire au quotidien environ 10^{11} érythrocytes. C'est de loin le plus haut rendement de production cellulaire du corps humain. Il peut s'adapter en fonction des besoins de l'organisme, cependant le moindre défaut de régulation ou blocage peut aboutir progressivement à une anémie, à des syndromes myéloprolifératifs ou à une transformation leucémique.

L'érythropoïèse est schématiquement divisée en deux phases: une phase de prolifération des progéniteurs érythroïdes, appelée **érythropoïèse précoce**, et une phase de différenciation des précurseurs érythroïdes, appelée **érythropoïèse tardive**.

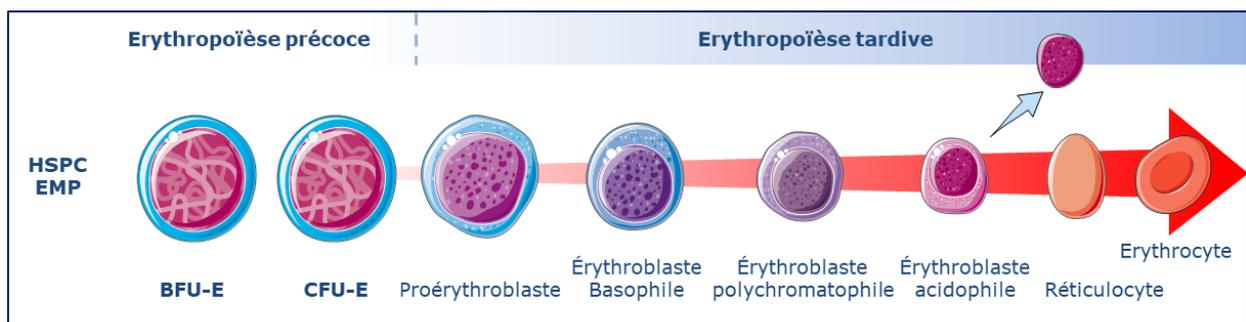


Figure 8: Schéma de la différenciation érythroïde. Une **CFU-E** (*colony forming-unit erythroid*) donne deux proérythroblastes (**Pro-E**), donnant deux érythroblastes basophiles I (appelés **baso I**), qui donnent à leur tour deux érythroblastes basophiles II (**baso II**), qui donnent deux érythroblastes polychromatophiles (**Poly-E**) suivit de deux érythroblastes acidophiles (**Acido-E**). Chacun de ces deux érythroblastes acidophiles deviennent ainsi un réticulocyte (par expulsion du noyau condensé) et est ensuite libéré dans la circulation sanguine. Ainsi, chez l'homme, une CFU-E donne environ 64 érythrocytes.

2.2. L'érythropoïèse précoce, du stade BFU-E au stade de CFU-E

Le premier progéniteur érythroïde identifié *ex vivo* est la **BFU-E** pour *Burst Forming Unit-Erythroid*. Ce progéniteur **différencie progressivement en CFU-E** (*Colony Forming Unit-Erythroid*). Ces deux progéniteurs ont été initialement décrits comme étant capables de donner des colonies exclusivement érythroïdes en méthylcellulose (milieu semi-solide supplémenté en facteurs de croissance). La BFU-E est composée d'amas « explosés » (*Burst*) de colonies généralement concentriques appelées CFU-E. La **Figure 9** montre une photo macroscopique d'une BFU-E et d'une CFU-E.

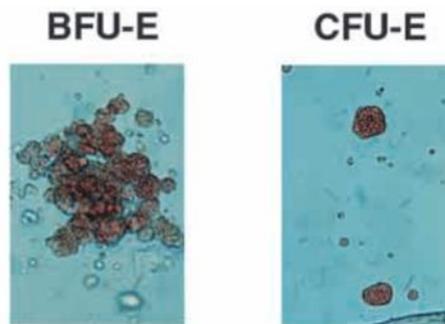


Figure 9: Photo macroscopique d'une BFU-E et d'une CFU-E observée en milieu semi-solide. Les BFU-E (*Burst forming Unit-Erythrod*) sont composées d'amas de CFU-E (*Colony Forming Unit-Erythroid*) ressemblant à de petites grappes de raisin, composées de 8 à 64 érythrocytes (moins de 100 érythrocytes). D'après (*J. Palis et al. 1999*)

Bien que ces deux progéniteurs ne soient pas distinguables morphologiquement, l'observation en milieu semi solide a d'abord permis de les identifier chez la souris (Heath et al. 1976) (C. J. Gregory 1976) puis chez l'humain (Gregory et Eaves, 1977). Chez l'humain, les BFU-E terminent leur différenciation et sont observables en méthylcellulose après 12 à 20 jours (6 à 12 jours chez la souris) contre 7 à 9 jours (1 à 3 jours chez la souris) pour les CFU-E. Il est important de noter qu'une colonie CFU-E, lors de son observation est composée de la progénie mature d'une CFU-E, c'est à dire uniquement d'érythrocytes. La colonie dite CFU-E contient environ 64 érythrocytes. **Les analyses par comptage de colonies en milieu semi-solide sont des analyses rétrospectives, où le contenu observé à un instant t est le résultat de différenciation d'un nombre de progéniteurs plantés à un instant x .** Il est possible aujourd'hui d'analyser ces progéniteurs en temps réel *via* la cytométrie en flux par distinction de leurs marqueurs de surface cellulaire.

En se différenciant, la BFU-E gagne progressivement des marqueurs de surface de maturation érythroïde comme le CD36 puis le CD71 (récepteur de la transferrine), tout en perdant des marqueurs de surface et récepteurs propres aux progéniteurs tels que le récepteur à l'interleukine 3 (IL3R) ou encore le CD34. Ainsi, chez l'humain, une BFU-E est caractérisée comme étant CD45⁺ (marqueur pan leucocytaire), GPA⁻ (glycophorine A), IL3R⁻, CD34⁺, CD36⁻, CD71^{Low}, tandis que les CFU-E sont CD45⁺, GPA⁻, IL3R⁻, CD34⁻, CD36⁺, CD71^{High}. Ainsi, ces deux précurseurs se distinguent principalement par l'expression du CD34, du CD36 et du CD71 (J. Li et al. 2014). La caractérisation des marqueurs de surface de ces progéniteurs a été dans un premier temps établi chez la souris (Terszowski 2005), où certains marqueurs de surface divergent quelque peu de l'humain. Ainsi, les CFU-E sont caractérisées comme étant Lin⁻, c-Kit⁺, Sca-1⁻, CD45⁻, IL-7R α ⁻, ter119⁻, CD41⁻, CD71⁺. La BFU-E se distinguant ici de la CFU-E par le CD45 qui est positif pour la BFU-E.

Dès 1977, Gregory et Eaves ont confirmé qu'il existait deux types de BFU-E donnant des *burst* en méthylcellulose de taille plus ou moins large (dépassant même le centimètre) et ayant donc un potentiel de prolifération différent (J. Wang et al. 2018) (Connie J Gregory et Eaves, s. d.). Ainsi, ces BFU-E sont appelées BFU-E *Early* pour les BFU-E les plus immatures (à plus grand potentiel de prolifération) et BFU-E *Late* pour les BFU-E les plus matures. Bien que certains travaux aient cherché à mieux caractériser ces deux types de BFU-E (Gao et al. 2016) sur la base de la distinction d'un récepteur de surface TGF- β RIII, d'autres travaux sont encore nécessaires pour parfaire cette identification.

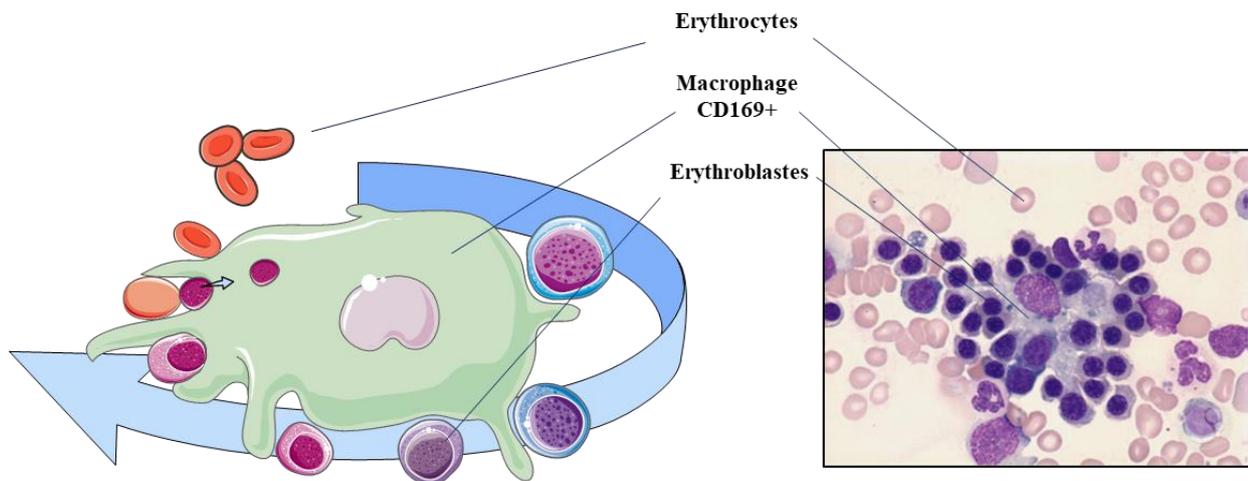
Si la BFU-E est considérée comme un précurseur capable de se maintenir et de proliférer sous l'influence de facteurs extérieurs (TGF- β , Glucocorticoïdes, ...) (Flygare et al. 2011) avant de donner une CFU-E, la CFU-E et sa progénie effectuent des divisions très restreintes et déterminées, moins dépendantes des facteurs extérieurs.

2.3. L'Erythropoïèse tardive: du stade CFU-E à l'érythrocyte, et l'îlot érythroblastique

Le facteur clé permettant la différenciation, l'expansion et l'apoptose des CFU-E est l'érythropoïétine (EPO) (Agoram et al. 2009). Les autres stades de différenciation ne sont plus dépendants de l'EPO, compte-tenu de la perte de l'expression du récepteur à l'EPO lors des stades de différenciation terminale (H. Wu, Liu, et al. 1995) (Kieran et al. 1996) (Lin et al. 1996).

L'érythropoïèse tardive (c'est-à-dire, la maturation terminale de l'érythropoïèse) est assurée dans le foie fœtal et dans la moelle osseuse (également dans la rate en cas d'érythropoïèse de stress chez la souris). Elle est assurée par des unités appelées **îlots érythroblastiques** constitués de macrophages entourés d'érythroblastes à différents stades de maturation. Ces macrophages sont nécessaires à la maturation terminale des érythroblastes comme pour le processus d'énucléation des érythroblastes acidophiles afin de devenir des réticulocytes ou encore « hématies » (Chasis 2006). La suppression des macrophages ¹provoque une anémie embryonnaire létale chez la souris (Iavarone et al. 2004). De plus, la découverte de molécules d'adhérences communes à la surface des macrophages et des cellules érythroblastiques telles que Emp souligne leur interaction. Des expériences de transfection permettant l'expression de Emp à la surface de cellules d'une lignée HeLa induisent une adhérence des érythroblastes à ces cellules. Ces travaux ont aussi montré que cette interaction avec les macrophages empêche l'apoptose des érythroblastes (Hanspal, Smockova, et Uong 1998), démontrant ainsi le rôle primordial du macrophage dans la maturation érythroïde. La **figure 10** représente le schéma ainsi que la photo d'un îlot érythroblastique.

¹par la perte de Rb (rétinoblastome), un facteur dépendant de Id2 et empêchant alors l'activité transcriptionnelle de PU-1, un gène majeur de la maturation et de l'engagement des macrophages,



La Figure 10: Schéma (gauche) et image (droite) d'un îlot érythroblastique. Tous les stades de maturation des cellules érythroïdes sont visualisés autour d'un macrophage qui accompagne et assure la différenciation des érythroblastes dans la MO.

La CFU-E se différencie en deux **Proérythroblastes (ProE)**, les premiers précurseurs distincts morphologiquement de la BFU-E, de la CFU-E et des progéniteurs hématopoïétiques. A la suite de 4 mitoses, le proérythroblaste humain générera 16 réticulocytes. Au cours de ces dernières étapes de maturation, les érythroblastes subissent une réorganisation du noyau, la condensation de la chromatine, la disparition des nucléoles, l'arrêt du cycle cellulaire et donc une diminution de la taille des cellules. Ces étapes étant caractérisées aussi bien morphologiquement que moléculairement, quatre stades sont distingués lors de cette maturation terminale: le **proérythroblaste** donnant deux **érythroblastes basophiles I** (appelés **baso I**), qui donnent à leur tour deux **érythroblastes basophiles II** (**baso II**), qui donnent deux **érythroblastes polychromatophiles (Poly-E)** suivis de deux **érythroblastes acidophiles (Acido-E)**. Chacun de ces deux érythroblastes acidophiles deviennent ainsi un réticulocyte (par expulsion du noyau condensé) et est ensuite libéré dans la circulation sanguine. Le noyau expulsé, appelé pirénocyte est phagocyté par le macrophage de l'îlot érythroblastique.

2.3.1. Caractérisation de l'érythropoïèse tardive humaine

Ces derniers stades de maturation sont ainsi observables au microscope à partir de lames de frottis (ou cytopspin) et colorées au May-Grünwald-Giemsa (MGG), un mélange de trois colorants contenant de l'éosine (colorant acide), du bleu de méthylène et de l'azur de méthylène (colorants basiques). Cette coloration permet d'apprécier la condensation du noyau au cours des différents stades de maturation, ainsi que l'acidification du cytoplasme au cours de la synthèse de l'hème et de l'hémoglobine. Ainsi, de la BFU-E à l'érythroblaste basophile, le cytoplasme est davantage basique, donc bleuté, possédant quelques vacuoles. Le polychromatophile comme son nom l'indique commence à s'acidifier (début de la production d'hémoglobine) donnant une teinte rose progressive dans le cytoplasme, le noyau étant de plus en plus condensé et petit. Quant à l'érythroblaste acidophile, sa chromatine est très condensée (petit noyau) et son cytoplasme rosé. Enfin, l'érythrocyte ne possédant plus de noyau, son cytoplasme reste rosé.

On peut également analyser et comparer la maturation terminale en cytométrie en flux via l'analyse des marqueurs de surface présents lors des différents stades de la maturation érythroïde. Les marqueurs de surface CD34 et CD36 ont déjà été décrits lors de la maturation progressive de la BFU-E en CFU-E (**page 25**). Le CD71 est faiblement exprimé à la surface des BFU-E, puis très fortement (nombre de récepteurs) sur la CFU-E et jusqu'au stade E-Poly et diminue par la suite (Nakahata et Okumura 1994). La glycophorine A (GPA) est exprimée progressivement du stade Pro-E jusqu'à la fin de la différenciation en réticulocyte. La BAND3 (protéine membranaire échangeuse d'anions) augmente progressivement à partir du stade Baso-E et l'intégrine- α 4 est fortement exprimée au stade Pro-E et diminue progressivement jusqu'à la fin de la différenciation (Hu et al. 2013).

2.3.2. Caractérisation de l'érythropoïèse murine

Chez la souris, les stades de différenciation sont conservés, mais les cycles cellulaires étant plus rapides, la différenciation à partir de la BFU-E s'effectue sur 7 jours contre 20 chez l'homme. Pour l'analyse par cytométrie en flux, seule la GPA est remplacée par le Ter119 qui est une protéine homologue. D'autres marqueurs sont utilisés tels que le CD44 (protéine d'adhésion)

dont l'expression diminue au cours de la différenciation érythroïde à partir de la CFU-E (K. Chen et al. 2009) (J. Liu, Mohandas, et An 2011).

La cytométrie en flux permettant d'analyser une répartition cellulaire sur au moins deux axes (abscisse et ordonnée), on peut ainsi suivre une différenciation érythroïde avec précision via l'utilisation de couples de marqueurs de surface tels que le CD34 et le CD36 aux stades CSPH/BFU-E/CFU-E. On ajoute ensuite le CD71 pour distinguer la BFU-E de la CFU-E, puis la GPA et enfin l'intégrine- α 4 et la band 3 jusqu'à la fin de la différenciation. La **figure 11** présente les morphologies des érythroblastes et récapitule l'expression des principaux marqueurs de surface analysés au cours de la différenciation érythroïde.

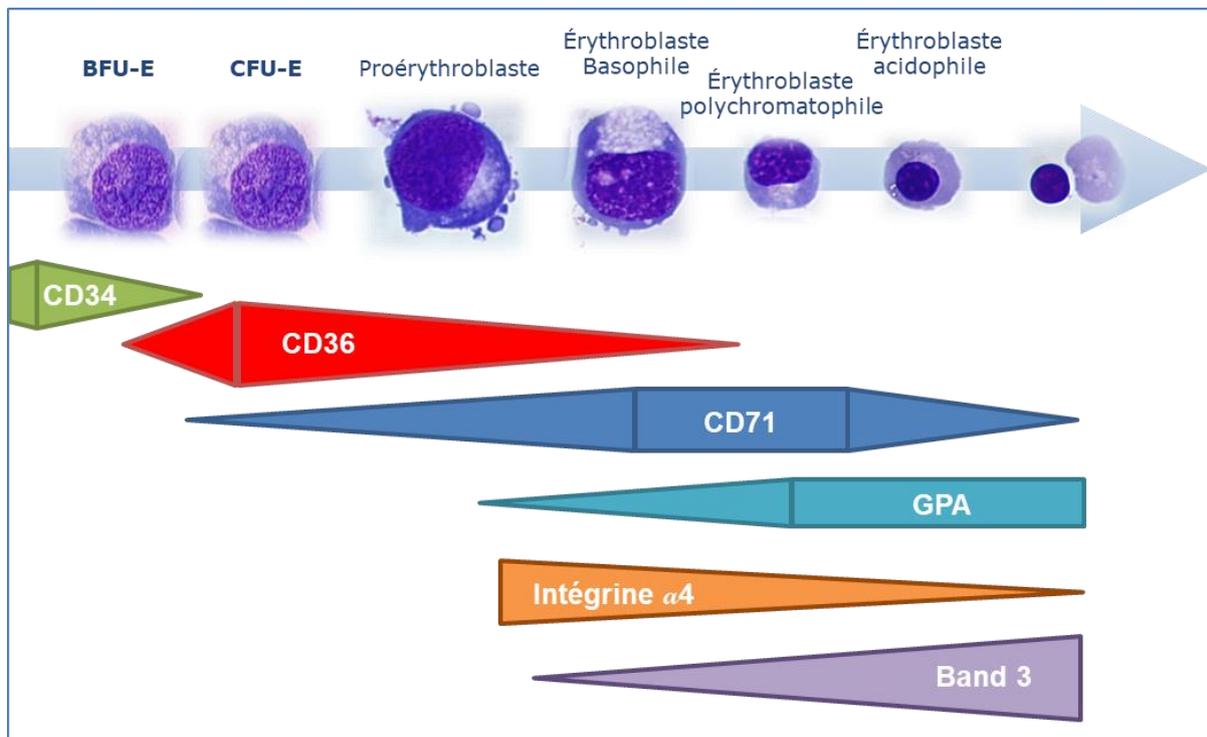


Figure 11: Distinctions morphologiques et expression de différents marqueurs de surface au cours de la différenciation érythroïde. Le CD34 diminue conjointement à l'augmentation de l'expression du CD36, entre la transition de la BFU-E à la CFU-E. Le CD71 est faiblement exprimé à la surface des BFU-E, puis très fortement (nombre de récepteurs) sur la CFU-E et jusqu'au stade E-Poly et diminue par la suite. La glycophorine A (**GPA**) est exprimée progressivement du stade Pro-E jusqu'à la fin de la différenciation en réticulocyte. La band3 (protéine membranaire échangeuse d'anions) augmente progressivement à partir du stade Baso-E et l'intégrine- α 4 est fortement exprimée au stade Pro-E et diminue progressivement jusqu'à la fin de la différenciation.

2.4. Régulation de l'érythropoïèse au niveau moléculaire

L'érythropoïèse est finement régulée par de nombreux facteurs de croissance assurant aussi bien le maintien, l'expansion, la maturation et la survie des progéniteurs et précurseurs érythroïdes. Une cytokine majeure de cette régulation est l'EPO, une protéine qui est parfois considérée comme une hormone du fait qu'elle est sécrétée par un organe situé à distance (le rein ou le foie) et régulée suivant le besoin en O₂ (via HIF) (Semenza et Wang 1992).

Les cytokines initialement nécessaires au maintien de la CSH sont indispensables pour l'érythropoïèse, comme c'est le cas du *Stem Cell Factor* (SCF). D'autres cytokines telles que la thrombopoïétine (TPO), le *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) et le FLT3L (FLT3 Ligand) ont un rôle dans l'érythropoïèse. Leur action a un double enjeu, permettant d'une part l'amplification et le maintien des CSH mais aussi l'orientation de ces CSH vers la différenciation mégakaryoblastique (médiée par la TPO) et granulomacrophagique (grâce au GM-SF et au FLT3L) (Birkmann et al. 1997) (M. Gabbianelli et al. 1995). GMP et EMP ayant un progéniteur commun (CMP), favoriser la différenciation de la CSH en CMP au détriment du CLP encourage ainsi l'érythropoïèse.

Il en va de même pour des cytokines permettant d'orienter les progéniteurs hématopoïétiques vers le EMP, comme c'est le cas de l'interleukine-3 (IL-3), de l'IL-6 et de l'IL-11 qui, de concert avec le SCF et l'EPO, permettent d'induire une érythropoïèse soutenue à partir de la CSH.

Le stade BFU-E possède nombre de récepteurs à cytokines ou hormonaux initialement non hématopoïétiques permettant d'agir sur sa prolifération et sa différenciation. C'est le cas de l'insuline (Miyagawa et al. 2000). Il a été démontré que l'insuline et l'IGF-1 (*Insulin-like growth factor*) ont une action pro-différenciatrice sur les BFU-E et CFU-E avec une augmentation du nombre de colonies obtenues en méthylcellulose mais cette fois de plus petite taille.

La BFU-E a également des récepteurs aux glucocorticoïdes, (Hattangadi et al. 2011) (L. Zhang et al. 2013) (H.-Y. Lee et al. 2015). Les glucocorticoïdes sont des corticostéroïdes largement utilisés pour leurs propriétés anti-inflammatoires. Ces récepteurs ont une capacité d'action en synergie avec l'EPO-R et c-Kit, permettant d'encourager une érythropoïèse durable en maintenant les BFU-E en prolifération (von Lindern et al. 1999). D'autres articles mettent

également en évidence une synergie d'action entre HIF1 α et les glucocorticoïdes, allant de pair avec l'hypothèse précédente (Flygare et al. 2011).

La BFU-E est également sensible aux œstrogènes. Ces hormones sexuelles, en réprimant l'activité transcriptionnelle de GATA-1, induisent l'apoptose des BFU-E ce qui conduit à une érythropoïèse moins efficace (Blobel, Sieff, et Orkin 1995) (Blobel et Orkin 1996). Chez la souris, des expériences préceptes suggéraient que les œstrogènes induisaient une anémie. (Fried et al. 1974). Des études beaucoup plus récentes, indiquent au contraire que des concentrations physiologiques de cette hormone favoriseraient l'érythropoïèse murine (Nakada et al. 2014) et humaine (H.-R. Kim et al. 2016).

Il a également été montré que certaines cytokines inflammatoires agissent négativement sur l'érythropoïèse comme c'est le cas du *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF α) (Johnson et al. 1989), le *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) (Sing et al. 1989) ou bien l'IFN γ (Interferon γ) qui déclenchent l'apoptose des CFU-E *via* une interaction avec la voie Fas/FasL (Dai et al., 1998) empêchant la synthèse d'EPO et sa signalisation anti-apoptotique (Vannucchi et al. 1994).

D'autres cytokines telles que le TGF- β 1 ainsi que d'autres membres de la superfamille du TGF- β ont également un rôle important dans l'érythropoïèse (Zermati et al. 2000) en agissant en tant qu'agents pro-différenciants et antiprolifératifs. Le TGF- β 1 en traitement chronique, même à très faible dose, provoque des anémies sévères chez la souris (K. L. Miller et al. 1992).

Dans la partie suivante, nous aborderons dans un premier temps le rôle du SCF, de l'EPO et de leurs voies de signalisation mises en jeu.

2.5. La régulation de l'érythropoïèse par des cytokines

2.5.1. Cas du Stem Cell Factor et de l'Erythropoïétine

Le Stem Cell Factor

Le Stem Cell Factor (SCF) est une cytokine majeure de maintien des CSH, des BFU-E et des CFU-E. Il est également produit par des cellules hématopoïétiques matures telles que les mastocytes et NK, rendant plus difficile certains traitements ou greffes de CSH conférant ainsi une réponse pro-inflammatoire non désirable (Uoshima et al. 1995). Il est produit par les cellules stromales de la niche hématopoïétique et son récepteur est le récepteur c-Kit. Le SCF existe sous deux isoformes produites par épissage alternatif de son ARNm, une forme soluble clivée lors de la maturation traductionnelle de la protéine, ainsi qu'une forme insoluble possédant un site transmembranaire. La forme insoluble est la forme la plus importante (Hsu et al. 1997), la forme insoluble ne se fixant au récepteur c-Kit que transitoirement, amenant même à la dégradation de ce dernier (Langley et al. 1993).

C-Kit est un récepteur à cytokines de classe 3, possédant une double activité tyrosine kinase dans ces domaines transmembranaires. La liaison du SCF à c-Kit entraîne la dimérisation du récepteur ainsi qu'un changement conformationnel permettant une autophosphorylation de son récepteur. Cette activité permet l'activation de voies de signalisation telles que la voie Ras/ERK, PI3K/AKT, la voie JAK/STAT ou l'intermédiaire PLC γ (phospholypase-C γ) (Rönstrand 2004) que nous détaillerons dans la suite de cette partie. Ces voies de signalisation confèrent aux cellules un avantage prolifératif (via JAK/STAT), de survie (via PI3K/AKT et PLC γ) et de migration (via les MAP Kinases et PLC γ). La perte d'expression de c-Kit entraîne dans le modèle murin, une létalité embryonnaire due à une anémie sévère (Nocka et al. 1989) ce qui montre l'importance de cette cytokine dans la différenciation érythroïde. Le SCF étant un facteur de prolifération et de maintien des cellules souches hématopoïétiques, il ralentit cependant la différenciation érythroïde (Koichiro Muta et al., 1995) (K Muta et al. 1994) (Endo et al. 2001). Le *c-Kit* étant de moins en moins exprimé au fur et à mesure de l'engagement d'un progéniteur dans la voie érythroïde, nous verrons qu'au stade CFU-E une expression conjointe de c-Kit et de l'EPO procure un effet de coopération synergique (H. Wu, Klingmüller, et al. 1995) potentialisant l'érythropoïèse (McNiece, Langley, et Zsebo 1991) (K Muta et al. 1994).

L'érythropoïétine: EPO

L'EPO est un facteur de croissance majeur de l'érythropoïèse. Sa découverte a été un grand pas en avant pour les traitements de l'anémie. Il est aussi administré aux insuffisants rénaux (dialyses) et aux patients traités aux chimiothérapies en vue d'améliorer leur hématoците. La déprivation en EPO entraîne la mort par apoptose des progéniteurs érythroïdes (Kelley et al. 1994) (M. J. Koury et Bondurant 1988). Il a été démontré que cette apoptose cellulaire touchait exclusivement la CFU-E dépendante de l'EPO (H. Wu, Liu, et al. 1995), contrairement aux autres stades de différenciation, n'exprimant d'ailleurs plus le récepteur EPO (EPO-R) (J. Zhang et al. 2003). Ainsi, l'EPO est un facteur de survie des CFU-E (Sawada et al. 1987) (Broudy et al. 1991).

L'EPO est généralement sécrétée par le rein mais d'autres organes peuvent aussi l'exprimer tels que le foie ou le cerveau. Les fibroblastes interstitiels du rein (Lacombe et al. 1988) et les hépatocytes du foie sont les cellules sécrétrices d'EPO (S. T. Koury et al. 1991) (Ostrowski et Heinrich 2018).

L'EPO est régulée au niveau transcriptionnel par le taux d'oxygène fourni aux organes. En effet HIF1 (*Hypoxia-inducible factor 1*), le facteur de l'hypoxie est le seul régulateur physiologique de l'EPO. En condition d'hypoxie, la sous-unité HIF α normalement sensible à l'oxygène n'est plus dégradée par le protéasome, est transloquée dans le noyau et dimérisée à HIF β et se lie à une région consensus HRE (*Hypoxia Responsive Element*) en amont de gènes cibles tels que celui de l'EPO (Jewell et al. 2001).

Le récepteur à l'érythropoïétine: EPO-R

L'expression de l'EPO-R est contrôlée par un gène clé de l'engagement érythroïde: GATA-1 (Zon et al. 1991). EPO-R est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs de cytokines de type 1, ne possédant pas de tyrosine kinase (pas d'activité enzymatique endogène). Elle a besoin d'une kinase, un facteur supplémentaire tel que JAK2, (Janus Kinase 2) permettant le transport de EPO-R à sa surface et la signalisation en aval de EPO-R (Constantinescu, Ghaffari, et Lodish 1999) (Huang, Constantinescu, et Lodish 2001). La liaison de l'EPO à son récepteur induit un changement conformationnel de la partie cytoplasmique de l'EPO-R permettant le recrutement de JAK2. Par phosphorylation croisée de EPO-R et de JAK2, il en résulte l'activation de trois voies de signalisation par le recrutement

de trois protéines: STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*) relatif à la voie des STAT, ERK (*extracellular-signal regulated kinase*) relative à la voie des MAP Kinases et/ou la voie PI3K/AKT (*phosphatidylinositol-3 kinase/Protein Kinase B*) (Jelkmann et al. 2008).

2.5.2. La voie des STATs

Les STATs sont des facteurs de transcription qui, sous leur forme inactive, véhiculent de façon latente entre le cytoplasme et le noyau. La phosphorylation de JAK2 entraîne un changement de conformation des récepteurs cytoplasmiques permettant l'ancrage de STAT5, sa phosphorylation et une homodimérisation entre STAT5 A et STAT5 B. Le dimère STAT5 A/B ainsi activé est transloqué dans le noyau pour activer des gènes cibles connus pour être anti-apoptotiques comme Bcl-x(L) (M. Socolovsky et al. 1999). Des travaux de Socolovsky et al, utilisant une souris invalidée pour STAT5 (STAT5a^{-/-}, STAT5b^{-/-}) ont mis en évidence que les érythroblastes de ces souris présentaient un fort taux d'apoptose, une prolifération réduite et une plus faible sensibilité à l'EPO. Malgré un hémocrite normal, ces souris ont un déficit de réponse lors d'une hématopoïèse de stress (érythropoïèse extra-médullaire chez la souris) ainsi qu'un fort taux d'EPO circulant. Certaines de ces souris ont une anémie persistante, dont l'érythropoïèse de stress permanente fait de la rate un organe d'érythropoïèse à part entière. Enfin, l'analyse cytologique de l'hématopoïèse de ces souris montre un accroissement du compartiment érythroïde immature du fait d'un défaut de maturation accompagné de l'apoptose de nombre de CFU-E (Lodish, Flygare, et Chou 2010). Ces expériences ont été confirmées en 2006 chez l'homme *via* notamment des expériences de surexpression d'une forme active de STAT5 et de Bcl-xL permettant ainsi d'obtenir en méthylcellulose des colonies CFU-E non dépendantes de l'EPO (Garcon et al, 2006).

2.5.3. La voie PI3K/AKT

La voie de signalisation PI3K/AKT est décrite comme mettant en œuvre divers mécanismes de survie cellulaire *via* phosphorylation et inhibition de nombreuses protéines pro-apoptotiques telles que la caspase 9, Bad les facteurs de transcription FoxO et la machinerie d'ubiquitination de P53 *via* phosphorylation de Mdm2 (Bouscary et al. 2003) (Verdier et al.

1997) (Haseyama et al. 1999) (Bruce E, *Erythropoiesis: an overview*, 2009). AKT module également la prolifération cellulaire *via* la régulation de la voie de signalisation mTOR/P70S6kinase (D.-H. Kim et al. 2002). PI3K est composée de deux sous-unités, la sous-unité régulatrice P85 et la sous-unité P110. L'hétérodimère P85/P110 induit PIP2 en PIP3 (*Phosphatidyl Inositol Phosphate*) qui permet le recrutement de AKT. AKT est ensuite phosphorylé par la PDK-1 (*phosphoinositide-dependent kinase-1*) et par mTORC2 (*Mammalian target of rapamycin TOR complex 2*) (Hresko et Mueckler 2005).

2.5.4. La voie des MAP Kinases

La voie de signalisation des **MAP Kinases confère un avantage prolifératif aux érythroblastes** (Dazy et al. 2003). La reconformation du récepteur cytoplasmique de l'EPO activé permet de créer des sites d'ancrages aux protéines adaptatrices SHC et GRB2. Ces protéines recrutent SOS permettant d'activer par cascade de phosphorylation, RAS, RAF puis les protéines MEK (MEK 1 et MEK 2). Les MEK phosphorylent et activent MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), également appelé ERK (*extracellular signal-related kinases*). RAF et ERK sont des serines/sélective-thréonine protéine kinases (sélective) et MEK est une serine/tyrosine/thréonine kinase. La propriété de ces kinases leur permet d'agir en rétroaction ou d'amplifier le signal de phosphorylation (Avruch et al. 2001). Les MAPK régulent l'activité de nombreux facteurs de transcription tels que c-MYC, connu pour activer de nombreux gènes régulant la prolifération cellulaire. Ils participent également à l'activation de nombreuses cyclines telles que Cdk4 et Cdk6 permettant le passage de la cellule en phase S (pour revue (Meloche et Pouyssegur 2007)). **Ainsi, le récepteur à l'EPO permet par ces voies de signalisation de réguler conjointement la prolifération, la différenciation et la survie des progéniteurs érythroïdes (Figure 12).**

Certaines mutations ont permis d'étudier en profondeur la physiopathologie des kinases JAK telles que la mutation **JAK2V617F** conférant une hypersensibilité voire même une indépendance à l'EPO ou à d'autres facteurs reconnaissant les récepteurs à cytokines de type 1 (et ayant besoin de kinase tels que les récepteurs au TPO, au GM-CSF, à l'IFN gamma, ...). Cette mutation de JAK2 vis-à-vis de l'EPO-R est responsable de certaines pathologies comme la polyglobulie de Vaquez (appelé aussi polyglobulie essentielle ou *polycythemia vera*)

caractérisée par une polyglobulie (augmentation importante du nombre d'érythrocytes) et une augmentation du volume globulaire total (James et al. 2005). Les voies STAT5, PI3K/AKT et MAPK sont suractivées dans cette pathologie.

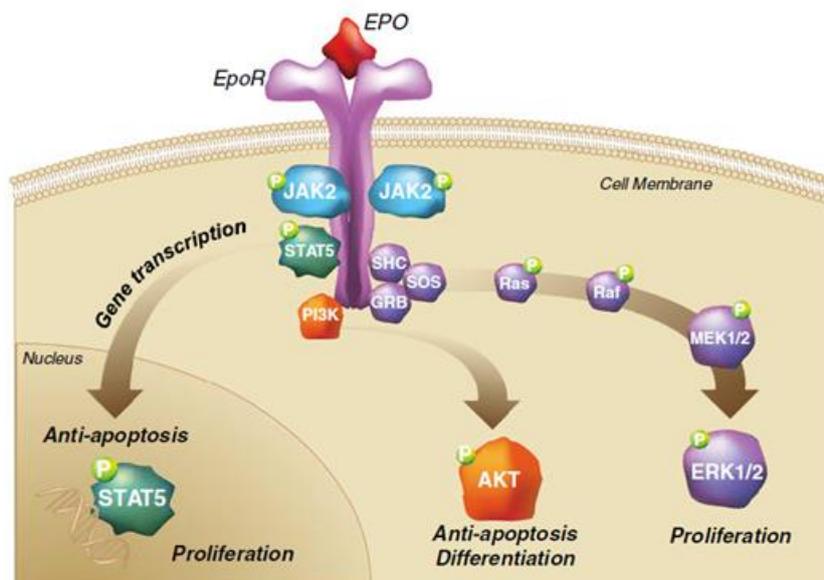


Figure 12: Schéma et rôle de la signalisation du récepteur à l'EPO. Après fixation de l'EPO à son récepteur, plusieurs voies de signalisation intracellulaires sont déclenchées, telles que STAT5, AKT et ERK (d'Après (Elliott et al. 2014)).

2.5.5. Coopération et synergie des récepteurs EPO-R et c-Kit-R

Une expérience permettant de mettre en évidence l'effet synergique de ces deux récepteurs est de mettre des HSPC dans de la méthylcellulose et de comparer trois conditions: avec supplémentation d'EPO, une de SCF ainsi qu'une dernière contenant ces deux cytokines. Le nombre de BFU-E et de CFU-E est décuplé en présence de ces deux facteurs comparés à la condition EPO seule qui contient peu de BFU-E/CFU-E et la condition SCF qui ne contient pas de BFU-E/CFU-E.

D'autres cytokines et hormones de croissance ont mis en évidence des effets de synergiques tels que l'IL3 (McNiece, Langley, et Zsebo 1991), des inhibiteurs du TGF- β 1 (Akel et al. 2003) que les glucocorticoïdes où l'utilisation de dexaméthasone, une hormone de synthèse, supplémenté avec l'EPO et du SCF augmente la prolifération des BFU-E au détriment de la différenciation BFU-E/CFU-E. Il semble cependant que les glucocorticoïdes soient sécrétés dans des conditions d'érythropoïèse de stress comme l'ont montré les travaux de Bauer réalisés chez la souris (Bauer et al. 1999).

En somme, il faut retenir que ce qui a un effet positif sur l'érythropoïèse agit en synergie avec l'EPO. Un effet additif ne prend part que lorsque les effets s'additionnent, or sans EPO il n'y pas d'érythropoïèse (car blocage de maturation au stade CFU-E, avant hémoglobinisation).

D'autres régulateurs ont cependant un effet négatif sur l'érythropoïèse en ayant pour action soit de l'empêcher (mécanismes d'apoptose *via* les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN, le TNF (Sing et al. 1989), soit de l'accélérer au détriment de sa prolifération, amenant un épuisement des progéniteurs érythroïdes (conduisant aux anémies). On pourrait aussi citer le TGF- β , un régulateur négatif majeur de l'érythropoïèse, mais nous l'aborderons dans le chapitre suivant.

2.6. Régulation transcriptionnelle de l'érythropoïèse

2.6.1. GATA1 et ses partenaires

L'engagement de la CSH dans l'hématopoïèse est finement régulé par des facteurs de transcription propres à la voie de différenciation choisie. Ainsi, le facteur de transcription jouant un rôle central dans l'engagement de l'érythropoïèse est GATA1, une protéine possédant un doigt de zinc pouvant se lier à l'ADN sur les motifs « G-A-T-A ».

La suppression de *Gata1* provoque un arrêt de maturation érythroïde au stade Pro-E ainsi qu'à une mort embryonnaire, causée par une anémie chez la souris (Pevny et al. 1995) (Y. Fujiwara et al. 1996). Son rôle est essentiel à l'érythropoïèse car même une expression de l'ARNm de GATA1 atténuée de 5% entraîne une mort embryonnaire à E11.5 à cause d'une érythropoïèse primitive inefficace (S. Takahashi et al. 1997).

GATA1 est vu comme une plateforme possédant de nombreux domaines fonctionnels permettant une interaction avec des facteurs transcriptionnels essentiels à la maturation et à l'engagement érythroïde tel que LMO2 (Warren et al. 1994), FOG1 (Tsang et al. 1998), SCL/TAL1 (Bockamp et al. 1995) (Shivdasani, Mayer, et Orkin 1995) et LDB1 (L. Li et al. 2010). L'invalidation de chacun de ces membres entraîne un défaut d'hématopoïèse, voire une mort embryonnaire. La **figure 13** représente les facteurs minimum dont l'expression est nécessaire afin d'induire une cellule en progéniteurs érythroïdes.

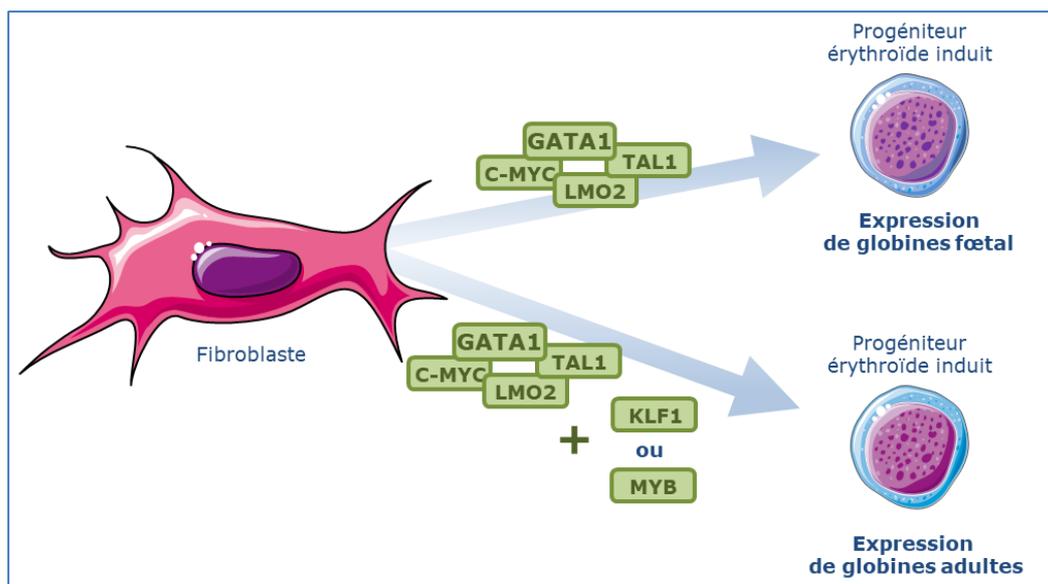


Figure 13: Schéma des partenaires de GATA1 minimum pour induire un fibroblaste en progéniteur érythroïdes. Adapté de (Capellera-Garcia et al. 2016)

Un autre facteur important de la régulation de l'érythropoïèse est le *Kruppel-like factor* (KLF1/EKLF) (I. J. Miller et Bieker 1993). KLF1 régule l'expression de nombreux gènes tels que l'expression du gène de la β -globine, des enzymes de biosynthèse de l'hème, des protéines de structure du cytosquelette du globule rouge, ou encore les antigènes des groupes sanguins (Hodge et al. 2006) (Nilson et al. 2006) (Basu et al. 2007).

Des travaux ont également montré que l'expression du gène *MYB* était nécessaire à l'érythropoïèse (Mucenski et al. 1991) (Tober, McGrath, et Palis 2008). Bien que ce gène ne soit pas nécessaire lors de l'érythropoïèse primitive, les souris invalidées pour ce gène meurent d'une anémie progressive à E15. D'autres observations ont également rapporté que les personnes atteintes de trisomie 21 ont une hémoglobine fœtale (et non adulte) causée par la dérégulation de *MYB* (Sankaran et al. 2011).

Pour corroborer les résultats de ces travaux, des chercheurs ont mis en évidence les facteurs de transcription minimum requis pour reprogrammer et convertir un fibroblaste en précurseurs érythroïdes (*induced erythroid progenitors/precursors*, iEPs). Les gènes primordiaux pour obtenir un progéniteur synthétisant de la globine adulte sont GATA-1, TAL-1, LMO2, c-MYC et KLF1 ou MYB (Capellera-Garcia et al. 2016). Les facteurs KLF1 ou MYB n'étaient pas requis pour convertir le fibroblaste en progéniteurs érythroïdes ayant l'aspect d'un progéniteur érythroïde fœtal. Le rôle de c-Myc dans la participation à l'érythropoïèse est cependant ambigu car ce gène n'est pas connu pour interagir avec GATA1, TAL1 ou LMO2, mais pour être l'un des quatre gènes nécessaires à la génération en *induced Pluripotent Stem Cell* (iPSC) à partir de fibroblastes (K. Takahashi et Yamanaka 2006).

Un autre gène impliqué dans la régulation de l'érythropoïèse est *Nuclear Factor-Erythroid 2* (NF-E2) (Andrews et al. 1993). Sa protéine est impliquée dans la maturation érythroïde. Elle est notamment responsable du recrutement de l'ARN polymérase de type II (Pol II) au niveau du gène de la β -globine, permettant son expression (Z. Zhou et al. 2010). Elle permet également, de concert avec GATA-1, de contrôler l'expression de l' α -spectrine, protéine responsable de la structure du globule rouge, de sa forme et de sa déformabilité (Boulangier et al. 2002).

Au cours de l'engagement dans la différenciation érythroïde, GATA1 inhibe l'expression de GATA2 (Suzuki et al. 2013) ainsi que d'autres facteurs d'engagement tels que PU-1, impliqué dans la différenciation myéloïde (Chou et al. 2009).

Aux cours de ces dernières décennies, il a été démontré que GATA2 active directement GATA1 pour s'engager dans la différenciation érythroïde, tandis que GATA1 induit sa propre expression (Grass et al. 2003). D'autres expériences ont aussi démontré que GATA2 était une cible de lui-même (Pal et al. 2004), montrant ainsi un beau modèle d'expression biphasique de ces facteurs ayant la capacité de s'auto-activer mais dans lequel GATA1 réprimerait également GATA2 après son activation par ce dernier. La **figure 14** est une représentation de l'activité de GATA1 et de GATA2 au cours de l'érythropoïèse.

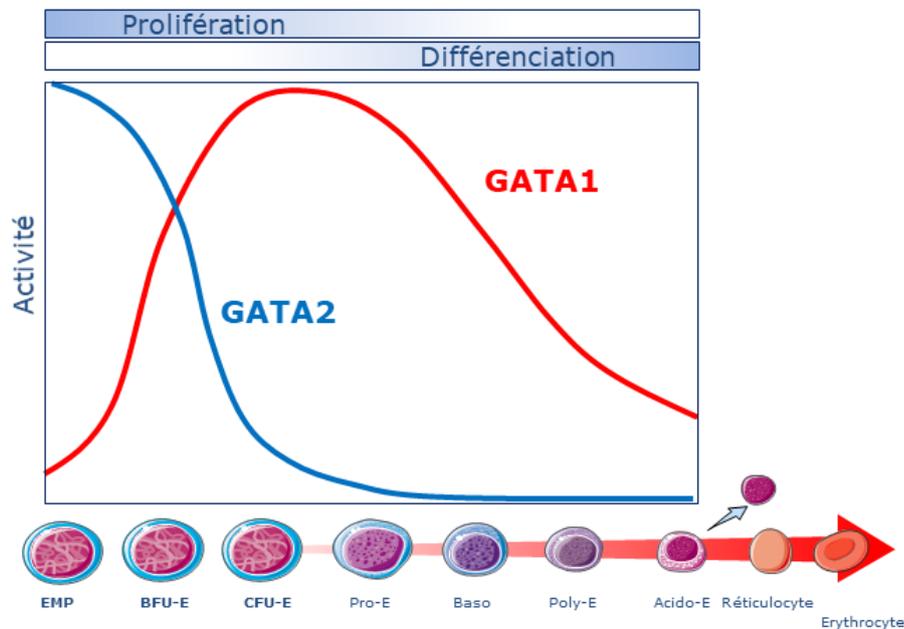


Figure 14: Profils d'expression des facteurs de transcription GATA1 et GATA2 au cours de l'érythropoïèse. L'expression de GATA2 précède celle de GATA1. Des régulations complexes entre ces deux facteurs de transcription aboutissent au remplacement progressif de GATA2 par GATA1, au cours de la maturation érythroïde. Adapté de (Ferreira et al. 2005)

Des expériences de ChIP ont révélé que 65% des sites de régulation de GATA2 sont identiques aux sites de fixation de GATA1, mettant en avant un mécanisme de *switch* entre ces deux partenaires (Fujiwara 2017).

GATA1 interagit également avec RUNX1 (Elagib et al. 2003) un régulateur majeur de l'hématopoïèse.

Au cours de la maturation érythroïde, deux autres gènes se sont révélés importants: il s'agit de Sox6 et de Bcl11A. Ceux-ci contrôlent l'expression du gène des globines. En effet, elles ne sont pas exprimées au cours de l'érythropoïèse primitive car elles répriment justement l'expression de l'hémoglobine embryonnaire ϵ (pour Sox6) et fœtale γ au profit de l'hémoglobine adulte β (Yi et al. 2006) (Sankaran et al. 2009).

2.7. Les étapes de la différenciation érythroïde terminale

La différenciation érythroïde terminale débute au stade de la CFU-E jusqu'à l'énucléation de l'érythrocyte acidophile pour devenir un réticulocyte. Lors de cette maturation, le volume du noyau est divisé par 10 (Ji, Jayapal, et Lodish 2008). Les mécanismes mis en jeu font essentiellement appel à des processus de compaction de la chromatine associés irrémédiablement à la répression de la plupart des gènes. Des travaux de recherche ont montré (par des expériences de CHIP-seq) que ces mécanismes faisaient en grande partie appel à des modifications des histones (Ji 2015), via notamment les histones désacétylases (HDAC).

La réduction de la taille du noyau mais aussi les changements de morphologie comme la diminution du volume du cytoplasme et la perte des organites lors des dernières étapes de maturation érythroïde s'apparentent également à un mécanisme d'apoptose. Des travaux comme ceux de Zermati *et al* ont suggéré qu'un mécanisme d'apoptose pouvait également rentrer en jeu (Zermati et al. 2001).

2.8. Les microARN au contrôle de l'érythropoïèse

Les microARN (miRs) sont de petits ARN non codants de 19 à 24 nucléotides, connus pour réguler l'expression post-transcriptionnel le de gènes *via* inhibition de la traduction de la protéine ou la déstabilisation d'un ARN cible avant sa traduction. Le premier miR (lin-4) a été identifié en 1993 dans le nématode *caenorhabditis elegans* (R. C. Lee, Feinbaum, et Ambros

1993). Depuis, leur rôle est bien mieux connu, ils interviennent dans la régulation de nombreux processus tels que la différenciation, la prolifération et l'apoptose. Dans l'hématopoïèse, les miRs jouent un rôle tout aussi souligné au sein de chaque lignage hématopoïétique ainsi que chez la CSH (Song et al. 2013). Leurs expressions aberrantes ont également été associées à de nombreuses maladies et cancers (LAM, SMD, ...). (Pour revue, (Vasilatou et al. 2010) (Hattangadi et al. 2011) (Bianchi et al. 2012)).

Ainsi, des équipes ont montré le rôle des miRs au cours de l'érythropoïèse, tels que mir-221 et mir-222 qui bloquent l'expression du récepteur c-Kit impactant la cellule souche et la forçant à se différencier dans le lignage érythroïde (Felli et al. 2005) (Marco Gabbianelli et al. 2010).

Par contraste avec ces résultats, d'autres miRs se sont révélés avoir un rôle négatif sur l'érythropoïèse tel que mir-150 (Lu et al. 2008), mir-155 (Georgantas et al. 2007) et mir-223 (Felli et al. 2009). Mir-150 est un régulateur négatif de MYB agissant sur le EMP favorisant une différenciation mégakaryoblastique aux dépens de l'érythropoïèse (Ebert et al. 2008). De récentes études ont également suggéré que mir-150 régulait négativement des protéines de membrane de l'érythroblaste telles que 4.1.R soulignant également son rôle dans la maturation érythroïde terminale (Z. Sun et al. 2015). Mir-155 est connu comme un régulateur négatif de l'érythropoïèse et de la myélopoïèse et semble favoriser la lymphopoïèse (Tam W et al, 1997). Quant à mir-223 il a été démontré comme régulateur négatif de LMO2 impactant ainsi sur la différenciation érythroïde (Felli et al. 2009). La **figure 15** est un schéma récapitulatif de l'action de ces miRs sur l'hématopoïèse.

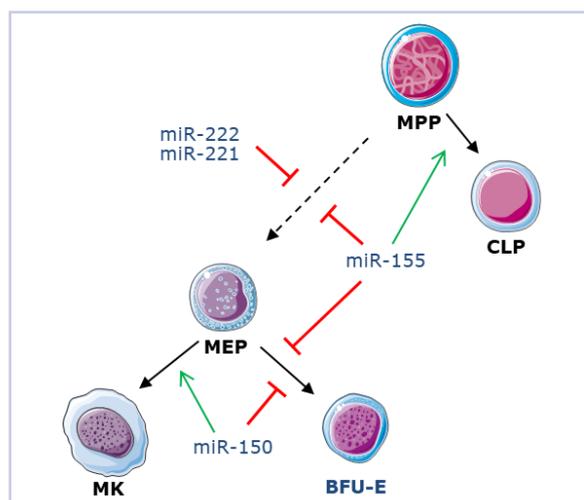


Figure 15: Schéma récapitulatif de l'action de certains miRs dans la régulation de l'érythropoïèse.

2.8.1. Rôle de la régulation des caspases au cours de l'érythropoïèse terminale

La régulation des caspases au cours de la différenciation érythroïde permet de contrôler le volume de production de réticulocytes et répondre au besoin en O₂ de l'organisme. Les mécanismes en jeu se font par l'intermédiaire d'une régulation positive pour favoriser l'érythropoïèse ou alors par l'intermédiaire d'une régulation négative dans le but de diminuer la production de réticulocytes. (Pour revue (Hermine et al. 2013)).

2.8.2. Régulation positive de l'érythropoïèse

Pour rappel, la voie STAT5 (activée *via* EPO-R) et GATA-1 contrôlent l'expression de Bcl-xL, lui-même étant une protéine anti-apoptotique. La signalisation EPO induit également la prolifération et la survie des érythroblastes *via* la voie PI3K/AKT et la voie des MAPK. La phosphorylation d'AKT peut également agir sur Bcl-xL *via* l'activation de protéines telles que BAD, permettant ainsi de se protéger de l'apoptose.

La régulation positive de l'érythropoïèse se fait ainsi principalement par l'inhibition de l'apoptose des érythroblastes par la présence de Bcl-xL. Ainsi, il va de soi que l'expression de l'EPO et de sa signalisation *via* EPO-R préserve les cellules érythroïdes de l'apoptose. Allant aussi dans ce sens, il a également été montré que l'EPO inhibait l'expression du récepteur de mort FasL dans les progéniteurs et précurseurs érythroïdes en favorisant ainsi l'expansion et la maturation érythroïde (Y. Liu et al. 2006).

2.8.3. Régulation négative de l'érythropoïèse

La régulation négative de l'érythropoïèse peut se faire par une régulation de la production d'EPO. Une diminution de l'EPO empêche l'expression de BCL-xL et ainsi expose ces cellules aux mécanismes d'apoptose. Cette régulation peut également se faire par un mécanisme paracrine *via* l'intermédiaire de récepteurs Fas.

Fas-L (Ligand), par interaction avec un récepteur Fas induit le recrutement de la caspase-8 activant à son tour la caspase-3 qui a pour effet le clivage d'un certain nombre de cibles telles que GATA1, en amenant à un arrêt de l'expression des facteurs de transcription érythroïde, et

ainsi à un blocage de la différenciation avec un arrêt d'expression de BCL-xL (De Maria, Zeuner, et al. 1999a). La caspase-8 peut également activer Bid ce qui a pour conséquence la dépolarisation de la membrane mitochondriale et libère le cytochrome C en aboutissant à la formation d'un apoptosome. Maria *et al.*, dans leurs travaux de recherche, ont également montré la même année que le mécanisme d'apoptose Fas-L/Fas avait lieu entre les érythroblastes matures (polychromatophile et acidophile) et les précurseurs érythroïdes immatures exprimant Fas-L et Fas respectivement, régulant négativement l'érythropoïèse *via* ce mécanisme (De Maria, Testa, et al. 1999b).

Ces travaux essentiels au fonctionnement de régulation de l'apoptose au cours de la différenciation érythroïde n'expliquent pas entièrement les mécanismes de réduction du noyau et de compaction de la chromatine au cours des étapes de maturation terminale. Même si la caspase-3 est connue pour activer des endonucléases au cours des mécanismes d'apoptose, son mécanisme d'action sur la compaction de la chromatine, la diminution graduelle du cytoplasme et de la chromatine n'ont pas encore été mis à jour. (Pour revue (Ji 2015a)).

2.8.4. Régulation de l'érythropoïèse par le métabolisme du Fer

Les érythroblastes ont un besoin important en Fer pour produire l'hémoglobine. La carence martiale est une cause majeure d'anémie. La régulation du taux plasmatique de ce métal est donc très importante. Elle fait intervenir des hormones comme l'hepcidine (synthétisée au niveau du foie) qui permet de réguler l'absorption de fer dans les tissus. L'hepcidine bloque l'entrée du fer dans les tissus en agissant sur la ferroportine, enzyme transportant le Fe^{2+} , et permet ainsi la séquestration et le stockage du fer intracellulaire (dans les entérocytes de l'intestin, mais aussi dans les hépatocytes, et les macrophages (Díaz et al. 2013)). En 2014, l'hormone érythroferrone (ERFE) a été identifiée. Elle est synthétisée par les érythroblastes et permet de bloquer la synthèse d'hepcidine pour ainsi augmenter la disponibilité du fer et permettre la production d'érythrocytes (Kautz et al. 2014) (Ganz 2018).

2.9. L'érythropoïèse de stress

Lorsque la MO ne peut soutenir l'érythropoïèse basale à elle seule, une seconde forme d'érythropoïèse a lieu, elle est appelée « érythropoïèse de stress ». Cette érythropoïèse prend souvent place pour compenser un stress anémique dû à une hypoxie des tissus et lors du développement embryonnaire. Ce stress anémique causant une hypoxie des tissus peut être lié à des syndromes d'insuffisances cardiaques, pulmonaires, à des anémies d'étiologie variées (que nous décrivons **page 49**): perte de sang, interventions thérapeutiques telles que les chimiothérapies et la greffe de cellules souches hématopoïétiques.

Ce processus résulte de l'activation d'un stress physiologique dans le but d'augmenter la distribution de l'oxygène aux tissus. En retour, la réponse principale de cette érythropoïèse de stress est essentiellement de fournir un nombre accru d'érythrocytes (Merav Socolovsky 2007). Ce stress physiologique a pour effet, par l'intermédiaire de HIF1, induit par l'hypoxie, d'activer drastiquement une sécrétion d'EPO par le rein (pour revue, (G. L. Wang et Semenza 1996)) permettant une érythropoïèse accrue (et une régulation positive de celle-ci, *via* les mécanismes de résistance à l'apoptose de ces cellules par l'EPO).

A la différence de l'homme, le modèle murin a une érythropoïèse extra-médullaire. Cette érythropoïèse se fait au niveau de la rate, un organe dont la plasticité permet de changer de taille en cas d'érythropoïèse accrue et où l'érythropoïèse de stress est facilement mise en évidence via l'observation d'une splénomégalie. En 2005, Lenox E et al ont mis en évidence dans la rate de souris un progéniteur érythroïde répondant spécifiquement à l'érythropoïèse de stress. Il s'agit d'une BFU-E sensible à une cytokine de la famille du TGF- β , la *bone morphogenic protein* (BMP4). Ces BFU-E (spécifiques à la souris), à la différence des autres BFU-E, n'ont besoin que d'EPO pour produire des *Burst* en méthylcellulose (ils croissent indépendamment du SCF et de l'IL-3) (Lenox, Perry, et Paulson 2005). Des travaux de transplantation ont montré que la greffe de progéniteurs hématopoïétiques de MO dans des rates arborait les mêmes propriétés que ces BFU-E de stress, montrant ainsi une signalisation propre à l'environnement splénique et dépendant de la voie de signalisation Hedgehog (Murtaugh, Chyung, et Lassar 1999) (Perry et al. 2009).

Bien que ces travaux soient intéressants, une telle voie de signalisation dépendante du BMP4 et de Hedgehog n'a pas été mise en évidence chez l'homme. Il a cependant été observé que les patients en récupération de greffe de CSH avaient une érythropoïèse ressemblant à

l'érythropoïèse fœtale, c'est-à-dire exprimant de l'hémoglobine fœtale (HbF) ainsi que ses antigènes de surface (Galanello et al. 1989) (Xiang et al. 2015). Des études ont également conforté ces observations dans d'autres contextes d'érythropoïèse de stress provoqués par des anémies telles que les β -thalassémies ou la drépanocytose abordées dans la partie suivante (Bank 2006).

2.10. Erythropoïèse fœtale et érythropoïèse adulte

Une question sous-jacente intéressante pour aller plus loin dans l'étude de l'érythropoïèse de stress chez l'homme est de comparer l'érythropoïèse adulte et l'érythropoïèse fœtale. De récents travaux de Yan H (H. Yan et al. 2018) ont consisté à la comparaison de ces deux types d'érythropoïèse réalisées à partir de HSPC de sang périphérique d'adulte (PB pour *peripheral blood*) ou de cordons ombilicaux de nouveau-nés (CB pour *cord blood*) induites en différenciation érythroïde *in vitro*. Hormis les différences d'expression d'hémoglobine fœtale et adulte, **l'érythropoïèse dérivée de HSPC de CB aboutit à la production de 4 fois plus d'érythrocytes**. Ils ont également montré que la cinétique d'induction de la différenciation était plus lente lors de l'érythropoïèse de HSPC dérivée de CB bien que le marqueur de surface CD34 disparaisse plus rapidement au cours de cette différenciation érythroïde (montrant un **engagement plus rapide dans la différenciation érythroïde**). Ne connaissant pas encore le processus, on peut suggérer que l'érythropoïèse de stress humaine peut s'attribuer certaines caractéristiques de l'érythropoïèse fœtale pour produire plus rapidement une forte quantité d'érythrocytes et pallier à un besoin accru.

2.11. Composition membranaire et du cytosquelette de l'érythrocyte au cours de la maturation terminale

L'érythrocyte mature est composé de trois éléments majeurs composant sa membrane et son cytosquelette: les filaments d'actine, les microtubules et des filaments intermédiaires. Ainsi, le cytosquelette est formé par un tétramère de deux hétérodimères d' α -spectrine et de β -spectrine ($\alpha\beta$ 2 tétramères). Ces filaments sont entremêlés par des oligomères d'actine pour former un réseau dans le cytoplasme. Ce réseau de spectrine est associé à la membrane

plasmique principalement par des complexes de protéines tels que celui de l'ankyrine ou celui du complexe 4.1 relié, entre autres, à la glycopherine C (GPC), à GLUT1 et Band-3 (Byers et Branton 1985).

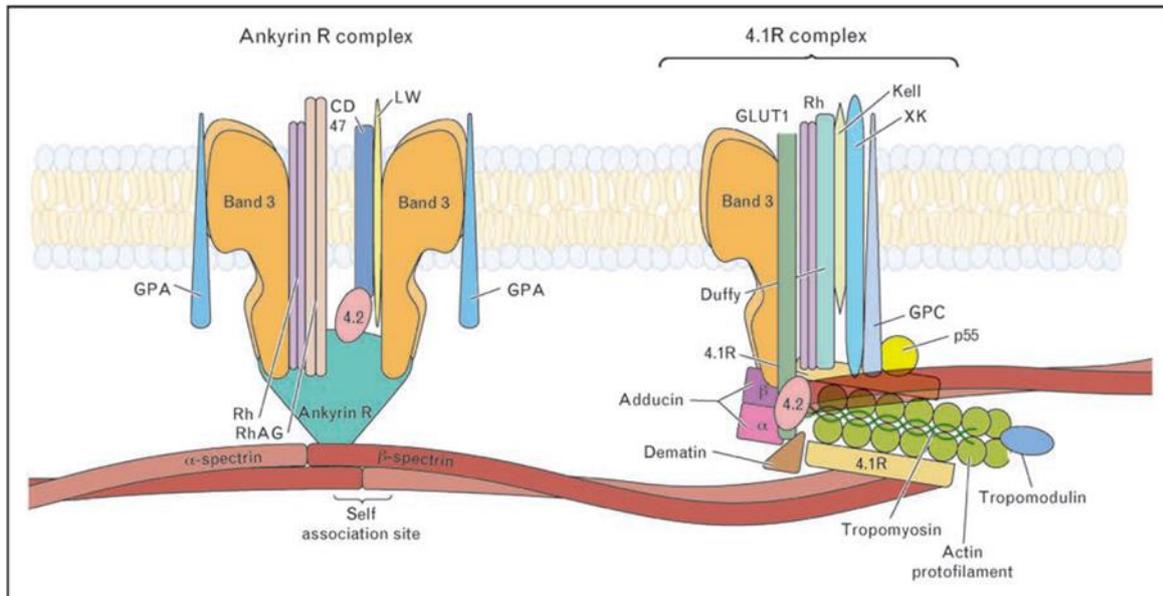


Figure 16: Représentation schématique des deux complexes protéiques membranaires principaux de l'érythrocyte. (J. Liu, Mohandas, et An 2011)

Les travaux de Reid et de Mohandas en 2004 ont montré qu'il existe plus de 50 protéines transmembranaires dont la moitié contient des antigènes responsables du groupe sanguin (Reid M et Mohandas N, 2004). Ces dernières protéines ont déjà été largement étudiées telles que band-3, GPA, GPC, Rh, RhAG, XK, Kell, Duffy, CD44, CD47, l'aquaporine 1 (AQP1), Lutheran (Lu) et les molécules d'adhésion intercellulaire-4 (ICAM-4). Comme band-3 servant de transporteur d'anion, Rh/RhAG servant de transporteur gazeux, Duffy servant de récepteur à chimiokine, Lu, CD44, ICAM-4 et les intégrines $\alpha 4 \beta 1$ $\alpha 5 \beta 1$ médient les interactions cellulaires et extracellulaires. D'autres protéines servent de transporteur ou de pompes telles que AQP1 sert de transporteur d'eau, GLUT1 et GLUT4 sont des transporteurs de glucose, NHE1 et Na/K-ATPase sont des échangeurs de sodium/hydrogène (Pour revue (J. Liu, Mohandas, et An 2011)) (**Figure 16**).

Au cours des étapes terminales de la différenciation érythroïde, les changements majeurs opérés dans les érythrocytes sont l'augmentation des protéines spécifiques au globule rouge (comme les antigènes de groupes sanguins) et la diminution des protéines d'adhésion telles que $\alpha 4$ et $\beta 1$ intégrines et le CD44, afin de permettre au réticulocyte de sortir de la moelle osseuse et de rejoindre la circulation sanguine (Eshghi et al. 2007) (K. Chen et al. 2009), pour revue (Ji 2015a, 2015).

Un grand « fantasme » du XXI^{ème} siècle est l'élucidation du processus d'énucléation de l'érythrocyte acidophile. Ce besoin vient en particulier du fait que la différenciation érythroïde *in vitro* n'aboutit pas à 100% d'érythrocyte anucléé, laissant penser que ce processus pourrait dépendre de facteurs extrinsèques à la cellule érythroïde.

Les mécanismes mis au jour dans le processus d'énucléation montrent une participation du cytosquelette d'actine. Un inhibiteur de l'actine, la cytochalasine D empêche la polymérisation des chaînes d'actine, rendant impossible l'énucléation des érythrocytes (Koury et al. Bondurant 1989). Des remodeleurs d'actine tels que la tropomoduline 3 (Tmod3) sont également importants pour ce mécanisme (Z. Sui et al. 2014). Après la dernière mitose cellulaire amenant l'érythrocyte polychromatophile en acidophile, il se produit une polarisation de l'érythrocyte acidophile *via* une action de microtubules régulés par Trim 58 et des dynéines, afin de retenir le noyau contre la membrane plasmique d'une extrémité de la cellule (Wang et al, 2012). D'autres études ont mis en évidence une action de protéines du cytosquelette telles que Tmod3 et les myosines afin de former un anneau d'actine au contact du noyau et de la membrane plasmique (Sui et al. 2014), permettant *via* la formation de vacuoles cytoplasmiques composées de survivine et de clathrine, d'éjecter le noyau (pyrénocte), hors du réticulocyte (Keerthivasan et al. 2010, 2012).

En plus du rôle des macrophages CD169⁺ de l'îlot érythroblastique dans la régulation de la maturation terminale des érythroblastes, de nombreuses évidences ont récemment souligné l'action de ce macrophage dans d'autres processus tel que l'érythropoïèse de stress (Socolovsky 2013) (Chow et al. 2013).

2.12. Les hémopathies

La production altérée d'érythrocytes peut être causée par un impact de l'érythropoïèse médullaire. Les hémopathies regroupent un vaste groupe de pathologies du sang, souvent caractérisées par des anémies. Les principaux groupes sont les hémoglobinopathies héréditaires², composées des syndromes thalassémiques, la drépanocytose et la *polycythemia vera*. Un autre groupe est celui des anémies inflammatoires (*ACD pour anemia of chronic disease*)³. Puis celui des syndromes héréditaires d'insuffisance de moelle osseuse (IBMFS).

Les syndromes héréditaires d'insuffisance de moelle osseuse (*inherited bone marrow failure syndromes*, IBMFS) (pour revue (Dokal et Vulliamy 2010)) sont des pathologies qui regroupent une classe très hétérogène de pathologies de la MO dans laquelle un, plusieurs ou tous les lignages hématopoïétiques peuvent être affectés. Les syndromes principaux de la

²La β -Thalassémie: L'hémoglobine est contrôlée par des groupes de gènes comprenant les α -like globines et les β -like globines. Ces groupes sont responsables de la formation de Hb A ($\alpha_2\beta_2$), la forme majeure de l'hémoglobine adulte. L'hémoglobine fœtale, est composée de gènes α -globines combinée à de la γ -globine pour former Hb F ($\alpha_2\gamma_2$). La β -thalassémie est caractérisée par une mutation au niveau du gène des β -globines résultant d'une production inéquitable de chaîne α et β amenant à des assemblages de tétramères de chaîne α instable compromettant la stabilité et la longévité de l'érythroblaste. Ces érythroblastes ont des déformabilités membranaires et des défauts de maturation aux stades tardifs de la différenciation (polychromatophile) (Centis et al, 2000). Ces dérégulations causent une anémie stimulant une tentative de compensation en augmentant cette érythropoïèse ineffective, responsable d'hépatosplénomégalie ainsi qu'une surcharge en fer due à la suppression de l'hepcidine (pour revue (Zivot et al. 2018)).

l' α -Thalassémie: Celle-ci est due à la présence d'une mutation au niveau du gène des globines α résultant d'un défaut de production de chaîne α , amenant à un excès de chaîne β formées. Les tétramères de chaîne β précipitent et conduisent à la lyse des globules rouges néoformés. Il s'ensuit une anémie hémolytique et une érythropoïèse inefficace. Ces patients sont sujets à des transfusions sanguines fréquentes pour compenser au mieux cette érythropoïèse inefficace.

La Drépanocytose: Cette maladie est un désordre autosomal récessif causé par une mutation ponctuelle causant une substitution d'un acide aminé au niveau de la chaîne de la β -globine. La chaîne de β -globine modifiée et assemblée en tétramère peut agir sur la forme du globule rouge qui le contient, en formant une forme plus étirée et rigide (Acquaye et al, 1988). Ces érythrocytes ainsi formés sont la cause de vaso-occlusions au niveau des capillaires et artérioles. Ces érythrocytes sont plus facilement sujet à hémolyse. Ces formes résultent ainsi d'anémie dues à l'hypoxie des tissus mais sont également accompagnés de nombreuses complications telles que des crises intenses de douleurs et des accidents vasculaires cérébraux (AVC).

Polycythemia vera (PV) ou maladie de Vaquez: C'est une maladie clonale myéloproliférative dans la MO. Elle est le plus souvent due à la mutation JAK2V617F rendant la voie JAK/STAT constitutivement active et indépendante à l'EPO. La PV est responsable d'une multitude de complications telles que les thromboses et les myélofibroses (Tefferi et al, 2013).

³Cette anémie est due à un taux élevé de cytokines inflammatoires circulantes telles que le TGF- β , l'IL-6, le TNF ou encore IFN γ . ACD est la seconde forme d'anémie la plus présente au monde, elle est souvent associée à une mauvaise qualité de vie (Locatelli et al, 2004).

IBMFS sont l'anémie de Fanconi (AF)⁴, l'anémie de Blackfan-Diamond (ABD), le syndrome de Shwachman-Diamond (SDS) et la thrombocytopénie Amégacaryocytaire (Amega). **Les patients souffrant de ces pathologies IBMFS présentent un risque accru de se transformer en syndrome myélodysplasiques (SMD) ou en leucémies aiguës myéloïdes (LAM).**

2.12.1. Exemple de la SMD 5q-

Les SMD regroupent des maladies hétérogènes de la CSH. Son incidence, en Europe est d'environ 4 nouveaux cas pour 100.000 habitants chaque année, et augmente considérablement avec l'âge (Fenaux et al. 2014). Souvent caractérisée par des défauts de maturation et une mort cellulaire importante des précurseurs myéloïdes, les SMD présentent des cytopénies pouvant impacter un ou plusieurs lignages hématopoïétiques (érythroïde, granuleux et/ou plaquettaire). Elles sont considérées comme un état pré-leucémique pouvant évoluer en LAM (dans environ 30% des cas).

La SMD avec délétion 5q isolée représente environ 5-10% des SMD, mais évolue plus rarement en LAM. Elle est le plus souvent mise en évidence par l'analyse du caryotype par la présence d'une large délétion interstitielle du bras long du chromosome 5 (SMD 5q-). Les patients présentent aussi une hypoplasie érythroïde (Arber DA et al, 2016 WHO). Les érythroblastes aberrants, deviennent apoptotiques au stade basophile par l'inactivation de GATA1 déclenché par les caspases en absence de HSP70 (Frisan et al. 2012). Au niveau cytologique le nombre de mégacaryocytes peut être augmenté et présente souvent des défauts de fragmentation du noyau (les mégacaryocytes ont un noyau plurilobé sur les frottis).

⁴ Anémie de Fanconie (AF): C'est une maladie héréditaire autosomale récessive (AR) mais peut également être liée à l'X (XLR). Elle se caractérise par des mutations de gènes qui codent pour des protéines responsables de la réparation de l'ADN tels que les 8 gènes de la famille des FANCA (FANCA, FANCB, FANCC, FANCF, FANCG, FANCL et FANCM) codant pour 16 protéines FA, qui par interaction entre elles activeront le complexe FANCI-FANCD2 capable de se lier aux protéines de réparation de l'ADN (de Winter et Joenje 2009). Les défauts de réparations de l'ADN peuvent entraîner des délétions ou réarrangements chromosomiques conférant progressivement un syndrome d'insuffisance d'un lignage hématopoïétique (ou de plusieurs), des anomalies congénitales comme une malformation du crâne ainsi qu'une susceptibilité à des transformations en pathologies variées (LAM, SMD, cancer ORL, cancer du foie, tumeur cérébrale, ...).

Anémie de Blackfan Diamond (ABD): C'est une maladie pédiatrique se caractérisant par une anémie (aplasie des globules rouges) ainsi que des malformations urogénitales ou cardiaques. Cette anémie est la conséquence d'une ribosomopathie causée par la mutation de protéines ribosomales de la petite sous-unité (essentielle à la transcription des gènes) RPS: tels que RPS24, RPS17, RPS7, RPS10, RPS26, RPS19 ou de la grande sous-unité, RPL: comme RPL5, RPL11 ou encore RPL35 (Yu, Wang, et Wu 2014).

Il est couramment entendu que la région communément « déléetée » du chromosome 5 responsable de cette hémopathie, serait située en 5q32-5q33. Elle comprendrait une quarantaine de gènes dont, *RPS14*. La perte d'expression de ce gène codant une protéine ribosomique récapitule à elle seule le phénotype de dysérythropoïèse de la SMD 5q (Ebert et al. 2008) (Dutt et al. 2011). Depuis cette découverte, la SMD 5q- est considérée comme une ribosomopathie. Les modèles murins indiquent que l'haploinsuffisance de *RPS14* induirait l'apoptose des érythroblastes de façon P53-dépendante (Schneider et al. 2016). Cependant d'autres gènes situés dans la région de 1.5 Mb communément déléetée (en 5q32-5q33) pourraient contribuer à cette pathologie. Il a récemment été montré que l'invalidation de mir143 et mir145 (tous deux situés en 5q32), conduisait à une perte de fonctionnalité des HSC et un phénotype myélodysplasique par un processus TGF- β dépendant (Lam et al. 2018).

3. La voie de signalisation du TGF- β

Le TGF- β est connu pour son rôle bipartite sur l'accélération de la différenciation érythroïde ainsi que son rôle sur la quiescence des CSH.

Cette voie de signalisation fait partie d'une grande famille d'effecteurs aux multiples facettes comprenant 42 membres (protéines) regroupés sous le nom de superfamille du TGF- β . Cette superfamille comprend également la famille Nodal, les Activines, les *bone morphogenetic proteins* (BMPs), et d'autres tels que les myostatines. Elles agissent sur la division cellulaire, la différenciation et les processus d'apoptose. Certains membres peuvent aussi agir sur l'adhésion, l'organisation et la migration cellulaire.

Les signalisations du TGF- β sont impliquées dans de nombreux types cellulaires et organes. Certains, comme les BMP, ont un rôle très fondamental pendant le développement embryonnaire et la formation de nombreux tissus ; leur rôle à initialement été découvert pour leur capacité à induire la formation d'os et de cartilage (chez les ostéoblastes et chondroblastes) (Nishimura et al. 2012).

Les Activines ont principalement un rôle dans la régulation du cycle ovarien (Lengil, Gancz, et Gilboa 2015), la spermatogenèse (Young, Wakitani, et Loveland 2015), la cicatrisation des épithéliums (Bamberger et al. 2005) et le développement de certains organes comme la prostate (Cancilla et al. 2001), les poumons et le rein (Maeshima et al. 2008).

Nodal a un rôle essentiel pendant l'embryogenèse lors de la formation du mésoderme et de l'endoderme ainsi que dans les mécanismes de maintenance des cellules ES (Shen 2007).

Nous verrons dans cette partie que les cytokines de la famille du TGF- β ont un rôle pléiotrope, ne nécessitant pas uniquement l'intervention de SMAD4 pour agir sur la transcription. Ils peuvent également recourir à l'action d'autres intermédiaires pour agir notamment sur la chromatine ou encore sur la biogénèse des miRs. Ainsi, cette famille est essentielle à l'autorenouvellement et à la différenciation des cellules souches ES et iPS, dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), dans la différenciation de nombreux types cellulaires y compris érythroïde, dans la régulation de l'homéostasie des cellules différenciées, et également dans les contextes de progression/suppression tumorales.

3.1. Description du mécanisme d'action *via* les récepteurs au TGF- β (TGF- β R)

Le TGF- β est un ligand reconnu par deux récepteurs TGF- β RI dimérisés. Cette liaison au TGF- β RI entraîne une tétramérisation de récepteurs avec un dimère TGF- β RII. Le complexe formé permet la transduction d'un signal intracellulaire *via* phosphorylation de TGF- β RII sur TGF- β RI pouvant ensuite déclencher la signalisation des SMAD.

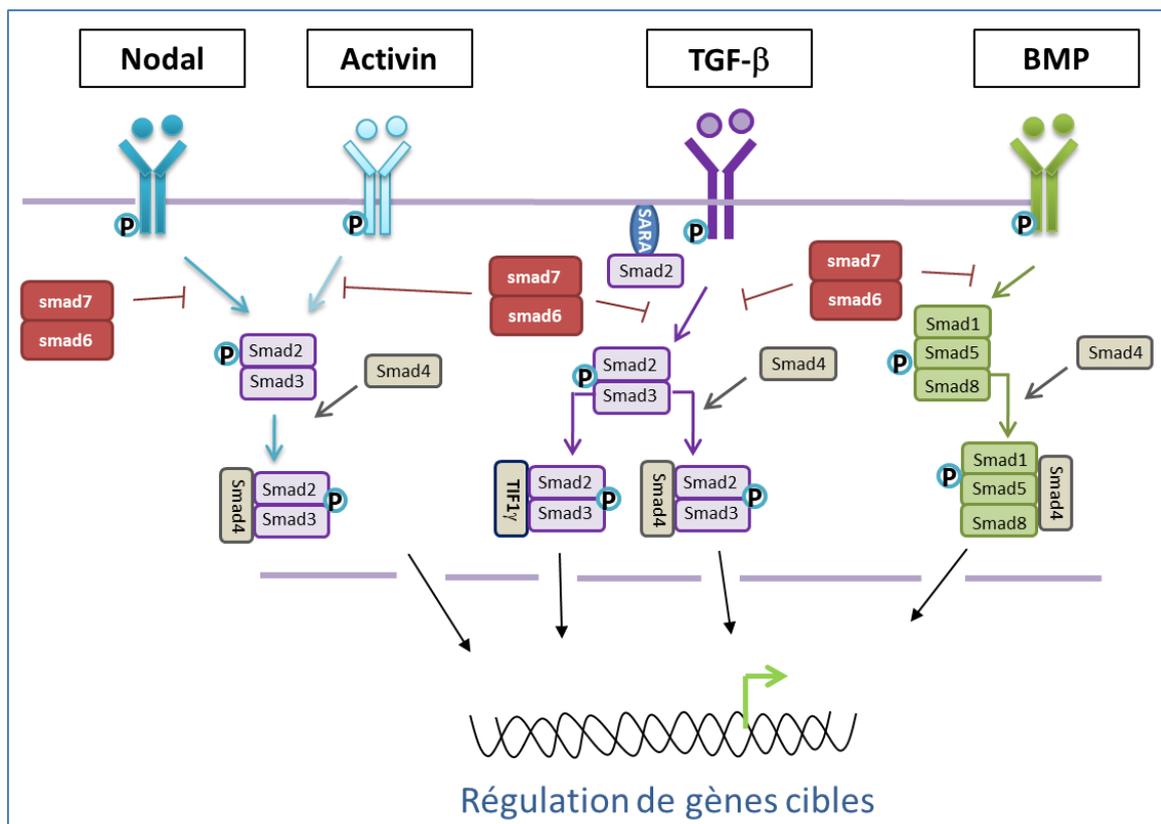


Figure 17: Schéma des différentes signalisations du TGF- β médiée par les SMADs.

Chez l'humain, il a été mis en évidence 7 récepteurs de type I et 5 récepteurs de type II. Ces récepteurs sont classés suivant leur affinité avec leurs ligands, ainsi TGF- β se lie aux TGF- β RI (également appelé ALK5) et TGF- β RII. Nodal et les BMPs partagent le récepteur activine de type 2A (ACVR2A) et 2B (ACVR2B). Les activines et Nodal ont en commun le récepteur activine de type I (ACVR1, également appelé ALK2), ACVR1B (également appelé ALK4) et

ACVR1C (également appelé ALK7). Les BMPs agissent également avec BMPR1A (également appelé ALK3), BMPR1B (également appelé LK6) et BMPR2 qui est un récepteur de type II.

3.2. Les protéines SMADs

Les effecteurs intracellulaires principaux de ces familles sont les protéines SMAD (*Small Mothers Against Decapentaplegic*) regroupées en trois catégories:

- Les R-SMAD agissant en tant que substrats des récepteurs membranaires de la famille du TGF- β et comprenant **SMAD1**, **SMAD2**, **SMAD3**, **SMAD5** et **SMAD8**.
- Le CO-SMAD, comprenant **SMAD4**, et agissant en tant que partenaire des R-SMAD et pouvant se transloquer dans le noyau pour activer des gènes cibles une fois en complexe avec des R-SMAD phosphorylés.
- Les I-SMAD, pour *Inhibitory-SMADs* comprennent **SMAD7** et **SMAD6**. Ils agissent par divers mécanismes dans le but soit d'empêcher l'association des R-SMAD entre eux, entre les CO-SMAD, soit d'empêcher leur phosphorylation au niveau des récepteurs. Dans certains cas les I-SMAD peuvent induire la dégradation des R-SMAD par le protéasome *via* le recrutement d'une ubiquitine ligase (X. Yan et al. 2016).

Les protéines SMAD sont des protéines comprenant 400 à 500 acides aminés et composées de deux régions globulaires au niveau N et C- terminales, reliées par une région de liaison (*linker region*). Ces régions sont très conservées entre les R-SMAD et CO-SMAD et sont appelées *Mad homology 1* (MH1) au N-terminal et *Mad homology 2* (MH2) à la partie C-terminale. Le domaine MH1 permet la liaison à l'ADN *via* un motif défini. Le motif MH1 est retrouvé conservé parmi les R-SMAD et CO-SMAD mais pas avec les I-SMAD qui n'en disposent pas. Le domaine MH2 permet l'interaction avec les autres R-SMAD, CO-SMAD ainsi que les I-SMAD (Shi et Massagué 2003) (Macias, Martin-Malpartida, et Massagué 2015) et est conservé parmi tous les SMADs.

Les SMADs sont normalement séquestrés à la membrane plasmique *via* des protéines d'ancrage SARA (*Smad Anchor for Receptor activation*) (Tsukazaki et al. 1998) proches des

tyrosines kinases des TGF β -R. Après phosphorylation du R-SMAD par le TGF- β R, SARA libère son étreinte. Le R-SMAD phosphorylé va se lier à un CO-SMAD au niveau de leur région de liaison (entre MH1 et MH2) et le complexe ainsi formé va être transloqué dans le noyau pour activer la transcription de leurs gènes cibles (Massagué, Seoane, et Wotton 2005).

Les R-SMAD SMAD2 et SMAD3 sont les substrats communs des récepteurs au TGF- β , Activines et Nodals, tandis alors que les SMAD1, 5 et 8 sont principalement des substrats des récepteurs aux BMPs.

3.2.1. Rôle du TGF- β dans la biogenèse des miRs

Il a été montré en 2010 que les R-SMADs, SMAD3 (via activation par le TGF- β) et SMAD1 (via activation par les BMPs), peuvent stimuler la maturation de certains miRs en coopération avec Drosha, le complexe de maturation de miR, une ribonucléase III. Par exemple, les R-SMAD sont essentiels à l'initiation de la maturation de certains miRs tels que miR-21. Les R-SMADs associés au complexe Drosha régulent le messager primaire pri-miR-21 en précurseur pré-miR-21 résultant de l'augmentation de l'expression de miR-21 (Davis et al. 2010). MiR-21 a pour rôle de cibler une région en 3'UTR (*Untranslated Terminal Region*) du I-SMAD SMAD7, permettant de réduire sa traduction et son expression protéique dans des cellules hématopoïétiques, favorisant ainsi la voie du TGF- β , amplifiant la maturation des miRs activés par cette voie de signalisation (Bhagat et al. 2013).

3.2.2. Rôle du TGF- β sur la chromatine

Il a été démontré que les R-SMADs pouvaient recruter les histones acétyltransférases (HATs) p300 et CBP pour stimuler la transcription en interagissant à leur tour avec les histones déacétylases (HDACs). De ces interactions possibles, les R-SMADs peuvent recruter TGIF1 et TGIF2 (*5'-TG-3'-interacting factor 1*) qui sont des partenaires d'interaction avec le

corépresseur CTBP (*C-Terminal-binding protein*) réprimant la signalisation TGF- β et Nodal par l'action de HDAC1 (Bannister et Kouzarides 1996).

3.2.3. Exemple de TIF1 γ

Il a également été démontré que l' *histone binding protein* TRIM33 (*tripartite motif containing 33*), également appelée TIF1 γ (Xi et al. 2011), interagissait avec SMAD2 et SMAD3. TIF1 γ possède de nombreux domaines d'interactions avec les histones et l'action du complexe TIF1 γ -SMAD2/3 est concomitante à celle du complexe SMAD4-SMAD2/3. Cependant, leurs cibles génomiques sont distinctes. Le complexe TIF1 γ -SMAD2/3 serait responsable du programme de différenciation érythroïde (transcription des gènes de β -globines...) alors que le complexe SMAD4-SMAD2/3 provoquerait l'arrêt du cycle et donc de la prolifération cellulaire (He et al. 2006). Ainsi, en condition de stimulation via le TGF- β ou Nodal, les signalisations SMAD4-SMAD2/3 s'exercent de concert avec la signalisation TIF1 γ -SMAD2/3. De plus, la fixation à la chromatine du complexe TIF1 γ -SMAD2/3 (sans SMAD4) permettrait un changement transitoire de conformation chromatinienne favorisant la fixation du complexe SMAD4-SMAD2/3 au niveau de ses gènes cibles (Quere et al. 2014).

3.2.4. Rôle de TGF- β dans l'autorenouvellement et la différenciation des cellules ES

La triade OCT4, SOX2 et NANOG est un complexe majeur responsable de la pluripotence des cellules ES (L. A. Boyer et al. 2005). Il a été montré que les BMPs stimulent l'autorenouvellement des cellules ES (de concert avec LIF (*leukemia inhibitory factor*), un activateur de STAT3) (Ying et al. 2003). Cette signalisation BMP active l'effecteur SMAD1 et l'expression des protéines Id, des inhibiteurs de la différenciation neurectodermique dans ces cellules, et favorisant la transcription des facteurs OCT4 et NANOG.

3.2.5. Rôle de TGF- β dans l'EMT et dans la reprogrammation des iPS

La transition épithélio-mésenchymateuse est un mécanisme crucial lors de la formation des tissus épithéliaux embryonnaires (somites, pancréas, foie, cœur...) (pour revue (Thiery et al. 2009)). Une des étapes importantes de l'EMT de la cellule épithéliale est la perte d'expression de ses marqueurs d'adhésion cellulaires, tels que l'E-cadhérine, empêchant ainsi les contacts avec les cellules environnantes. Ce processus est médié par un groupe de facteurs de transcription tels que SNAIL1, SNAIL2, ZEB1 (*zinc-finger E-box-binding homebox 1*), ZEB2, KLF4 (*Krueppel-like factor 4*), TCF3 (également appelé E47) et TWIST. Il a été démontré que SNAIL1 est induit par les TGF- β 2 et 3 pour induire par exemple le développement des ventricules du cœur (A. S. Boyer et al. 1999).

Le processus d'EMT étant décrit comme un processus physiologique ayant un rôle essentiel au développement embryonnaire, il est également impliqué dans le développement tumoral, à l'origine notamment de la transformation de la cellule et ses capacités tumorigènes (Peinado, Olmeda, et Cano 2007) (pour revue, (Bierie et Moses 2006)). Ainsi, l'expression anormalement soutenue de ces facteurs clés de l'EMT peut transformer une cellule épithéliale mammaire en cellule souche mammaire, lui donnant ainsi un phénotype de cellule onco-initiatrice (Scheel et Weinberg 2011).

Compte-tenu du rôle du TGF- β dans l'EMT, un processus de reprogrammation cellulaire, on comprend son rôle dans la reprogrammation des iPS. Les iPS, des cellules pluripotentes, sont obtenues à partir de la coexpression de 4 facteurs clés (OCT4, KLF4, SOX2 et MYC) dans un fibroblaste ou une autre cellule différenciée (K. Takahashi et Yamanaka 2006). Il a été suggéré que OCT4 et SOX2 interfèreraient avec SNAIL1 alors que KLF4 favoriserait l'expression de l'E-cadhérine, permettant davantage un processus de MET (*mesenchymal to epithelial transition*) (Li R et al, 2010). Ainsi, l'ajout d'inhibiteur du TGF- β ou du récepteur au TGF- β , empêcherait l'action ectopique de ces gènes et favoriserait ainsi la génération d'iPS (Maherli et Hochedlinger 2009).

3.2.6. Rôle du TGF- β dans la réponse immunitaire

Le TGF- β a également un rôle important dans la réponse immunitaire ainsi que dans le maintien de l'immunité. Notamment, il régule la sélection et le maintien de l'homéostasie des lymphocytes T, en inhibant les LT cytotoxiques (CTL), Th1 et Th2 tout en activant les LT-reg, Th17 et les Th9. Il est aussi le garant de la prolifération de la survie et de l'activation des LB tout comme le développement et l'activation des NK, macrophages, DC et des granulocytes.

(Pour revue (David et Massagué 2018) (Sanjabi, Oh, et Li 2017))

3.3. Rôle du TGF- β dans l'hématopoïèse

3.3.1. Rôle du TGF- β dans la balance quiescence versus autorenewement des CSH

Dans des conditions physiologiques, la majeure partie des CSH sont en quiescence, une propriété responsable de leur maintien dans le temps (Cheshier et al. 1999) (A. Wilson et al. 2008) (D. Sun et al. 2014). Le TGF- β joue un rôle antiprolifératif sur les CSH. La suppression de cette quiescence a pour conséquence de réduire cette capacité de maintien jusqu'à même aboutir à un épuisement des capacités intrinsèques de ces cellules (multipotence et capacité de reconstitution à long terme) (Soma, Yu, et Dunbar 1996) (Batard et al. 2000). Il a été démontré dans les HSPC que le TGF- β 1 intervient dans l'arrêt du cycle cellulaire et la quiescence de ces cellules *via* p57, un inhibiteur de CDK (*cyclin-dependent kinase*) (Scandura et al. 2004).

Il a été démontré que la suppression de la signalisation des R-SMADs, médiée par une surexpression de SMAD7, augmente les capacités d'autorenewement des CSH. Une expérience semblable, mais avec cette fois-ci une délétion de *Smad4*, amène un phénotype similaire montrant ainsi que la signalisation TGF- β empêche l'autorenewement des CSH (Karlsson et al. 2007). Pour étoffer ces résultats, de récents travaux de Wang Xiaofang et al, 2018 (X. Wang et al. 2018) ont montré dans la souris que l'ajout du TGF- β 1 supprime l'autorenewement des CSH, les empêchant d'entrer en quiescence ce qui impacte également leur capacité de reconstitution à long terme.

3.3.2. Rôle de TGF- β dans l'engagement des progéniteurs hématopoïétiques

Les gènes clés de l'engagement mésenchymateux, ou lymphoïde, myéloïde et érythroïde sont respectivement *myogenic identity factor myoblast determination protein-1* (MYOD1), PU.1, CCAAT/*enhancer-binding protein- α* (C/EBP α) et GATA1. Des travaux ont montré le rôle de TGF- β dans la spécification de ces lignages hématopoïétiques et mésenchymateux (Mullen et al. 2011) (Trompouki et al. 2011). Ainsi, *via* la signalisation du TGF- β , le complexe SMAD3-SMAD4 co-occupe le génome avec en partenaire MYOD1 ou PU.1. La signalisation BMP, semble quant à elle contrôler la régulation de gènes d'engagement *via* le complexe

SMAD1-SMAD4 en collaboration avec C/EBP α ou GATA1 et GATA2 dans les progéniteurs myéloïdes et érythroïdes respectivement (Mullen et al. 2011) (Trompouki et al. 2011). L'action de R-SMAD-SMAD4 dans le maintien des cellules ES ainsi que son apport dans l'engagement hématopoïétique, démontrent le rôle prédominant du TGF- β dans l'orchestration de cette régulation.

Bien que le mécanisme ne soit pas encore démontré, on sait également maintenant que le TGF- β stimule à faible dose la prolifération de HSPC à caractère myéloïde, au détriment de HSPC à caractère lymphoïde (Challen et al. 2010). Ce dernier résultat conforte l'hypothèse que les HSPC sont un *pool* hétérogène de progéniteurs, comprenant des progéniteurs déjà engagés dans le lignage myéloïde ou lymphoïde bien que non distinct phénotypiquement.

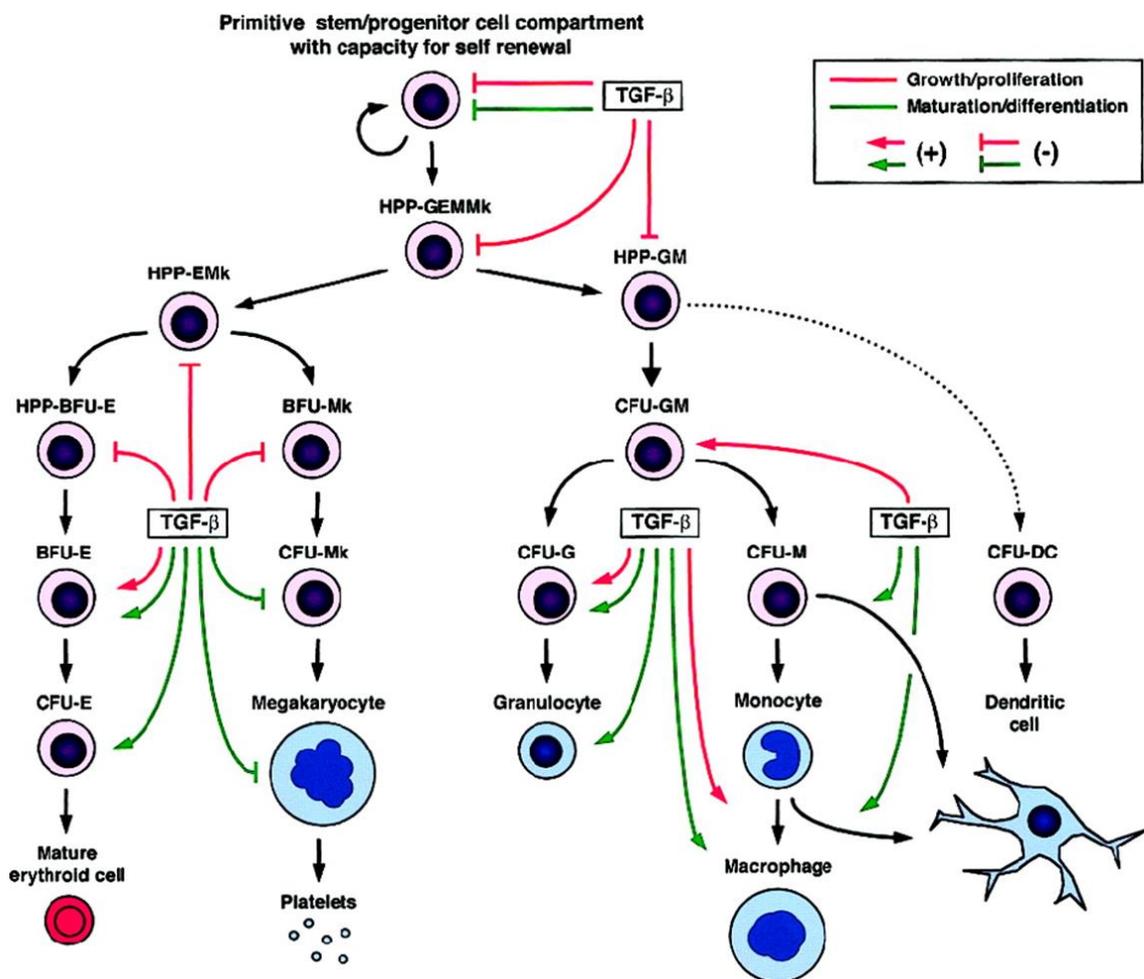


Figure 18: Effets du TGF- β sur la régulation de la croissance/prolifération et la maturation/différenciation lors du développement des cellules hématopoïétiques D'après (Fortunel, Hatzfeld, et Hatzfeld 2000)

Les rôles du TGF- β sur l'hématopoïèse sont résumés dans la **figure 18**. Le TGF- β a été reporté comme **ayant un rôle négatif** (c'est-à-dire anti-prolifératif) et anti-différenciant **dans le lignage mégakaryocytaire** (Jackson et al. 1994) (Berthier et al. 1993). Un anticorps anti-TGF- β (déplétant) ajouté en culture liquide augmente la prolifération des progéniteurs mégakaryocytaires chez le rat (Kuter DJ et al, 1992), bien que les mégakaryocytes produisent du TGF- β 1 qu'ils stockent dans des vésicules et les libèrent notamment en présence d'IL-3 ou d'IL-1 (Wickenhauser et al. 1995).

Il a également été démontré un rôle du TGF- β sur le développement des cellules dendritiques à partir de la différenciation de précurseurs myéloïdes ou monocytaires en DC (Y. Zhang et al. 1999) (Jaksits et al. 1999).

3.4. Rôle du TGF- β 1 dans la différenciation érythroïde

La voie du TGF- β est un des facteurs clés de la différenciation érythroïde. Elle est retrouvée non seulement dans la différenciation des progéniteurs mais aussi des BFU-E et CFU-E (Hatzfeld et al. 1991) (Del Rizzo, Eskinazi, et Axelrad 1990) (Cardoso et al. 1993). Historiquement, Krystal (Krystal et al. 1994) fut le premier à démontrer dans des cellules humaines primaires, que le TGF- β 1 permet et accélère la transition des BFU-E *early* en BFU-*late* et des BFU-E *late* en CFU-E, de façon concomitante à une accélération d'expression de marqueur de surface de maturation érythroïde GPA ainsi qu'une hémoglobinisaison plus rapide de ces cellules (Dubois et al. 1993). Au début du XXI^e siècle, les travaux de Zermati *et al.* ont mis à jour le mécanisme d'action du TGF- β dans l'inhibition de l'érythropoïèse. Ses travaux ont montré que le TGF- β , même à une faible concentration (de 2ng/mL) inhibe la prolifération et donc l'expansion des progéniteurs érythroïdes CD36⁺ **d'un facteur 15 (Figure 19, A)**, ces cellules CD36⁺ étant apparentées à un mélange hétérogène de BFU-E et de CFU-E principalement. Cette chute de prolifération est accompagnée d'une **forte accélération de maturation érythroïde** (visualisée en cytométrie en flux, test d'hémoglobinisaison, examen histologique et microscopie électronique) causée par une diminution du cycle cellulaire des progéniteurs érythroïdes (davantage de progéniteurs en G0/G1). Cette accélération de

maturation ne change pas pour autant le motif d'expression des chaînes de globines adultes et fœtales. Les érythrocytes ainsi formés sont normalement énucléés bien qu'il soit connu que la culture *in vitro* de précurseurs érythroïdes, en l'absence de macrophage CD169⁺, n'aboutit pas à 100% d'enucléation.

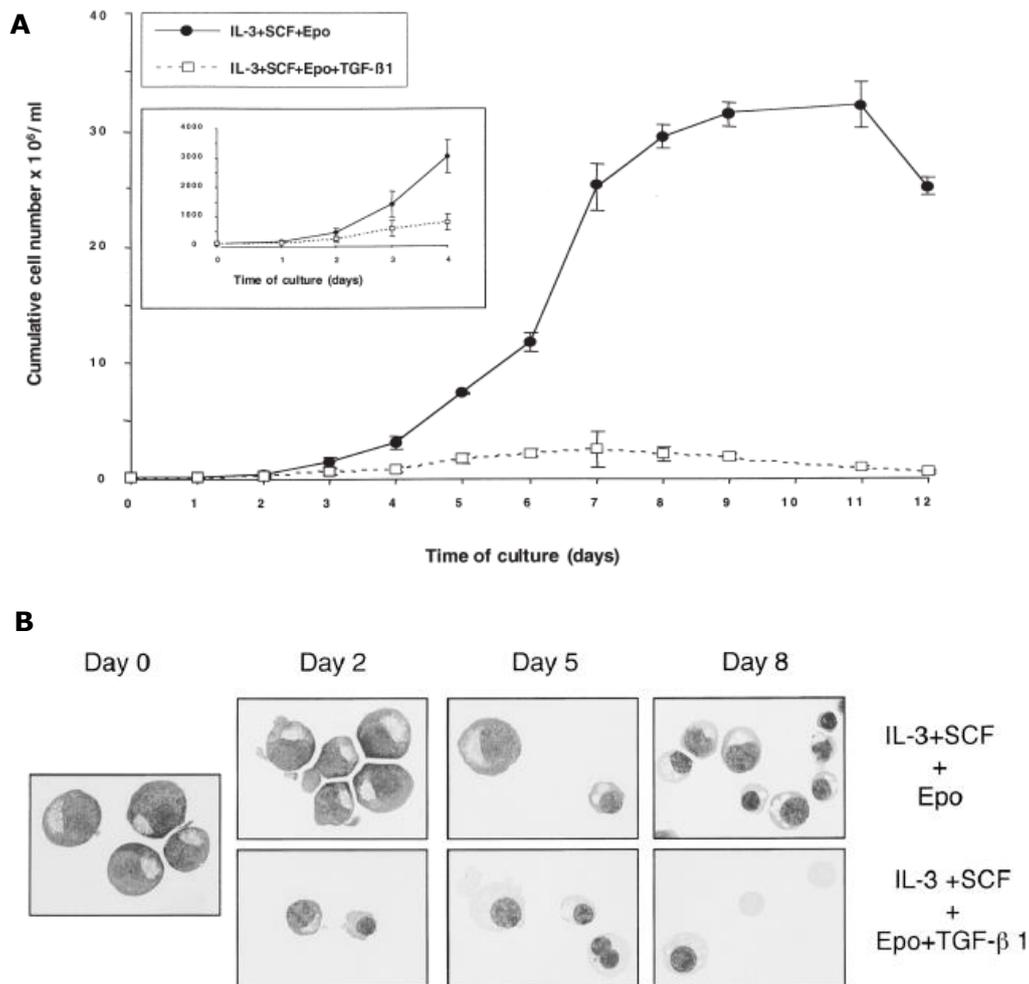


Figure 19: Mise en évidence de l'effet du TGF-β au cours de l'érythropoïèse. L'ajout de TGF-β au cours de la différenciation érythroïde impacte grandement le nombre de cellules produites (A), en accélérant la maturation des érythroblastes (B). Travaux de (Zermati *et al.* 2000).

Depuis ces articles fondateurs, de nouveaux travaux sont venus agrémenter nos connaissances quant à l'action du TGF-β1 dans la différenciation érythroïde. En 2003, les travaux de Akel *et al.* ont montré chez l'humain que le TGF-β1 était sécrété de manière autocrine en culture *in vitro* par les progéniteurs et précurseurs érythroïdes. Il a utilisé un

anticorps anti-TGF- β 1 qui supprime l'effet autocrine, ce qui ralentit l'érythropoïèse et augmente le nombre total d'érythrocytes générés, bien que le nombre de colonies en méthylcellulose reste apparemment le même (Akel et al., 2003). Concernant le mécanisme d'action emprunté dans la voie du TGF- β , on sait également que le complexe SMAD2/3-SMAD4 permet d'arrêter le cycle cellulaire et la prolifération érythroïde, tandis que SMAD2/3-TIF1 γ permet l'expression des gènes importants de la différenciation érythroïde, ces deux phénomènes étant conjoints (Bai et al. 2010) (He et al. 2006).

3.5. Rôle des autres cytokines appartenant à la superfamille du TGF- β au cours de la différenciation érythroïde

3.5.1. Cas de l'activine A, du BMP2 et du BMP4

Bien que sur l'érythropoïèse, TGF- β 1 soit le principal effecteur dans la voie de signalisation du TGF- β , d'autres effecteurs ont été recensés tels que l'**activine A** ou encore des BMP tels que **BMP2** et **BMP4**. Tout comme il avait été démontré que l'érythropoïèse de stress chez la souris était médiée par BMP4, les travaux de Perry *et al.* ont montré que BMP4 accélère la maturation des progéniteurs érythroïdes en bloquant la prolifération (Perry et al. 2009). Les travaux de Maguer-Satta *et al.* ont également porté sur l'étude de ces trois effecteurs. Ce groupe a rapporté que dans les HSPC dérivées de PBMC ou de MO, la différenciation érythroïde en présence d'activine A aboutit à la formation de davantage de *late* BFU-E et de CFU-E et que le BMP2 favorise la manifestation de *early* BFU-E (Maguer-Satta et al. 2003).

3.5.2. Cas de GDF11 et de GDF15

D'autres facteurs appartenant à la famille du TGF- β ont un rôle dans l'érythropoïèse tels que les GDF, comme GDF11 et GDF15 (Suragani et al. 2014), dont le mécanisme d'action n'est pas encore connu exactement. Il existe cependant déjà des inhibiteurs de ces GDF tels que ACE-011, ACE-536, des inhibiteurs *Ligand-Trap* de GDF11, constitués du domaine

extracellulaire du récepteur ActRIIA lié à un fragment constant (Fc) IgG1 humain (Ruckle et al. 2009). Il a été rapporté que le ligand trap de GDF11 pouvait corriger le défaut d'érythropoïèse dans des souris considérées comme des modèles de β -thalassémie (Dussiot et al. 2014) ou de SMD (Suragani et al. 2014). Cependant, la plupart de ces expériences ont été réalisées *in vivo*, les effets observés sur l'érythropoïèse seraient à confirmer au cours de l'érythropoïèse *in vitro*, en absence d'autres cellules du microenvironnement. En effet, les GDF pourraient exercer leur effet de façon indirecte en agissant sur les macrophages, et les ostéoblastes.

Dans la suite de cette partie nous allons traiter brièvement la question des inhibiteurs de la voie de signalisation du TGF- β ainsi que de certaines pathologies dans lesquelles l'utilisation de ces inhibiteurs ont, ou pourraient, avoir une utilité thérapeutique.

3.5.3. Inhibiteurs des TGF- β R

L'intérêt de cibler la voie de signalisation du TGF- β offre une portée thérapeutique attrayante. Bien que dépassant son rôle dans l'érythropoïèse et sa responsabilité dans certaines anémies, le TGF- β est impliqué dans de nombreux processus tumoraux comme jouant un rôle important aussi bien dans l'angiogenèse, l'inflammation, l'invasion/métastase ou encore le processus d'échappement au système immunitaire (Pour revue (Lahn et al. 2015)). Ainsi, nombre d'inhibiteurs ont été créés, certains sont en phase d'essai clinique tels que le Galunisertib (également appelé LY2157299) (Xie et al. 2015), le LDN-193189 un inhibiteur spécifique des BMPs, qui inhibe transcriptionnellement ACVR1 et BMPR1A (Boergermann et al. 2010). Ou encore le SB-431542 (Laping et al. 2002), un inhibiteur du TGF- β RI.

4. Etude du gène *CXXC5*, alias *RINF*

Ce n'est qu'en 2009 qu'ont été réalisées les premières études fonctionnelles sur *CXXC5*, lui attribuant alors un rôle dans trois voies de signalisation: la voie Wnt/ β -caténine (Andersson et al. 2009), la signalisation des rétinoïdes (Pendino et al. 2009) et la régulation de l'apoptose (M. Zhang et al. 2009a). Depuis, une quarantaine d'articles sont venus étoffer les connaissances sur ce gène, que ce soit par des études cliniques, analytiques ou fonctionnelles, réalisées aussi bien chez l'homme que dans des modèles animaux (souris, rat, poisson zèbre, chèvre).

De ces études, il apparaît que ce gène interviendrait dans la différenciation et le développement de nombreux tissus. Il interviendrait également dans le processus de tumorigénèse ayant un rôle ambivalent, pouvant être oncogène ou suppresseur de tumeur selon le contexte cellulaire. Son expression est étroitement corrélée au pronostic dans certains cancers solides (comme le cancer du sein ou de la prostate) et les leucémies. Son expression presque ubiquitaire suggère que *CXXC5* aurait un mode d'action moléculaire multiple, entre partenaire protéique et cofacteur de la régulation génique (voire même épigénétique).

Je me propose de détailler dans cette partie, avec un regard critique, les différents processus et modes d'action dans lequel *CXXC5* serait impliqué.

4.1. Localisation chromosomique et structure du gène *CXXC5*

Le gène *CXXC5* est situé sur le bras long du chromosome 5 (5q31) (**Figure 20 A**), dans une micro-région fréquemment perdue par délétion chromosomique dans certaines hémopathies malignes (SMD et LAM). Le gène codant la protéine *RINF* est composé de quatre exons (**Figure 20 B**), avec un site d'initiation de la transcription sur chacun des deux premiers exons. Ainsi, un épissage est possible et aboutit à deux ARNm *RINF* avec un 5'-UTR différent mais une séquence codante inchangée (le codon d'initiation de la traduction ATG est situé dans l'exon 3 et le codon stop est situé dans l'exon 4).

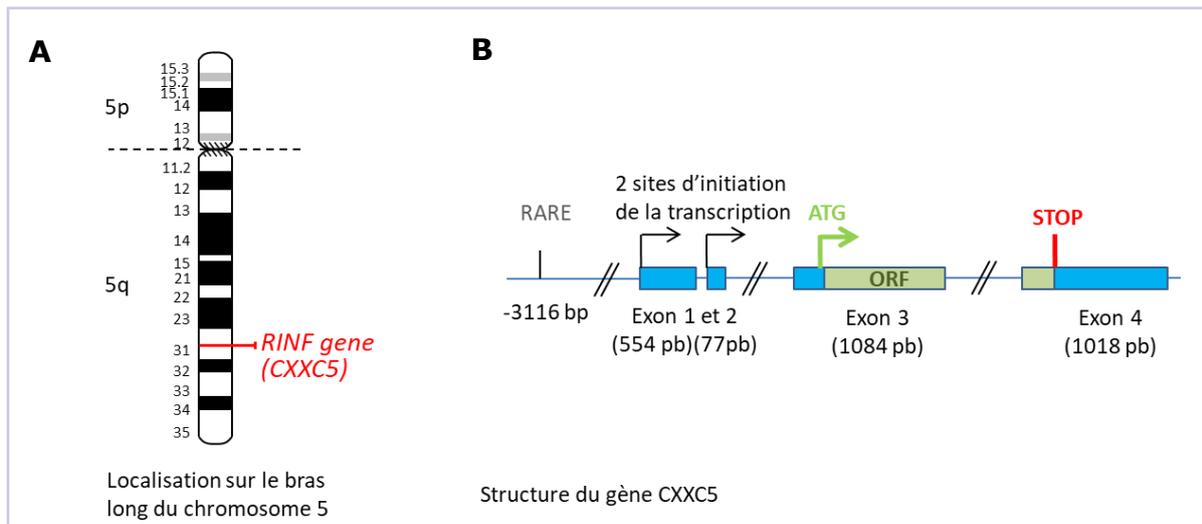


Figure 20: Représentation schématique de la localisation **(A)** et de la structure **(B)** du gène CXXC5, codant le facteur nucléaire RINF. Composé de 4 exons, ce gène possède deux sites d'initiation de la transcription. L'analyse de son promoteur révèle de nombreux sites de fixation potentiels, mais peu ont été validés par l'expérimentation, comme c'est par exemple le cas pour l'élément de réponse aux rétinoïdes (RARE). La séquence codante est située majoritairement sur l'exon 3 et en partie sur l'exon 4 (d'après Pendino et al. 2009).

4.2. Analyse de sa structure protéique primaire

CXXC5 code pour une protéine de 322 acides aminés (33kDa). L'étude de la séquence de la protéine a permis d'identifier que CXXC5 possédait une séquence NLS (Signal de Localisation dans le Noyau). Ces travaux de Pendino *et al.* ont démontré sa localisation nucléaire de cette protéine (du moins dans les cellules NB4 et MCF7). Des études de mutagenèse dirigée ont montré que la mutation de cette séquence empêchait effectivement la translocation au noyau. (M. Zhang et al. 2009b). Bien que cette protéine possède ce NLS, nous verrons par la suite que sa localisation semble dépendre du contexte cellulaire, étant très bien décrite dans la littérature comme partenaire de DVL (*Dishevelled*) lui conférant **une localisation plutôt cytoplasmique**, permettant d'inhiber la voie Wnt/ β -caténine.

4.3. RINF, un probable régulateur épigénétique

Un doigt de zinc pour les gouverner tous

La séquence du gène *CXXC5* a initialement été découverte en 2004 par Katoh *et al.* lors d'une étude *in silico* (Katoh et Katoh 2004) mettant pour la première fois en évidence les gènes codant pour des protéines de la famille CXXC. Cette famille a été définie comme contenant un motif à doigt de Zinc de type CXXC. Il s'agit d'une séquence particulière de 8 cystéines. La plupart de ces cystéines sont séparées par deux acides aminés « xx » au sein du motif. Ces protéines sont également appelées *zinc finger protein* (ZF-CXXC), du fait que les groupements Cystéines du motif CXXC comprennent deux ions zinc.

Le motif CXXC est un motif en doigt de zinc composé de deux groupements très conservés riches en cystéines et renfermant deux ions zinc (Zn^{2+}). Il existe une douzaine de protéines possédant des CXXC (revue Long H, 2013) (Katoh 2004) (Xu et al. 2018).

De par ce motif ces protéines ont la capacité de se lier à l'ADN au niveau des Cytosines de la chaîne nucléotidique. Il est souvent admis que les cytosines ciblées par ces CXXC sont situées sur des CpG⁵ qui sont simplement une succession nucléotidique d'une cytosine suivie

⁵ Par convention, il est établi qu'une région de 1kb comprenant au moins **50% de CpG** est appelée **îlot CpG**. Du fait que ces îlots CpGs soient retrouvés dans 60 à 80% des régions promotrices des gènes, il est suggéré qu'ils jouent un rôle dans la régulation des gènes (Bird 1986). Les Cytosines des CpG peuvent subir des modifications post-répliationnelles telles que le phénomène de méthylation (en position 5, appelé 5-méthylcytosine) qui est une modification stable (Coulondre et al. 1978). Il a été démontré que cette méthylation des CpG avait le plus souvent pour conséquence d'empêcher la fixation de facteurs de transcription au niveau des promoteurs, impactant ainsi la transcription. Cette méthylation des CpG sont notamment responsable de l'empreinte parentale et de l'inactivation du chromosome X (A. Bird 2002). Ces modifications sont également souvent associées à des complexes co-represseurs également un état de répression de la chromatine *via* l'activité des histones déacétylases (HDAC).

Les Histones permettent le repliement et la compaction de l'ADN. Il est facile de comprendre que le degré de compaction de l'ADN est déterminant pour l'accessibilité et donc pour l'expression de gènes (permettant ou empêchant la machinerie transcriptionnelle de se fixer aux promoteurs d'un gène). Les modifications post-traductionnelles des histones, méthylation, acétylation, ubiquitination phosphorylation, et déamination sont déterminants pour la conformation des histones. Ces processus de modification d'histones réversibles font appel à des enzymes comme les HDAC, ou encore les histones acétylases (HAT) (Kuo et Allis 1998).

La méthylation de l'ADN est un processus également réversible dans lequel interviennent des enzymes comprenant un doigt de zinc comme les protéines de la famille des MBD (*methyle binding protein*), MBD1-2 (Long, Blackledge, et Klose 2013), et DNMT1 ou n'en comprenant pas comme pour DNMT3. Ces enzymes ont des rôles spécifiques et permettent d'effectuer des méthylation *de novo* sur

d'une guanine. Il en existe à de multiples endroits à travers le génome que ce soit dans les régions géniques ou intergéniques.

Un premier classement de ces enzymes a été proposé en fonction de leur homologie de structure, par la présence ou non d'un motif **KFGG** (succession d'une lysine, phénylalanine et de deux glycines) entre deux groupements cystéine impactant ainsi sur la taille et la flexibilité des doigts de zinc. CXXC5, CXXC4, TET1 et TET3 font partie des CXXC à « doigt court » notamment par l'absence de ce motif KFGG, possédé par CFP1, MLL1, MLL2, KDM2A, KDM2B, MBD1, DNMT1 et FBXL19 qui sont des CXXC à « doigt long » (**Figure 21**).

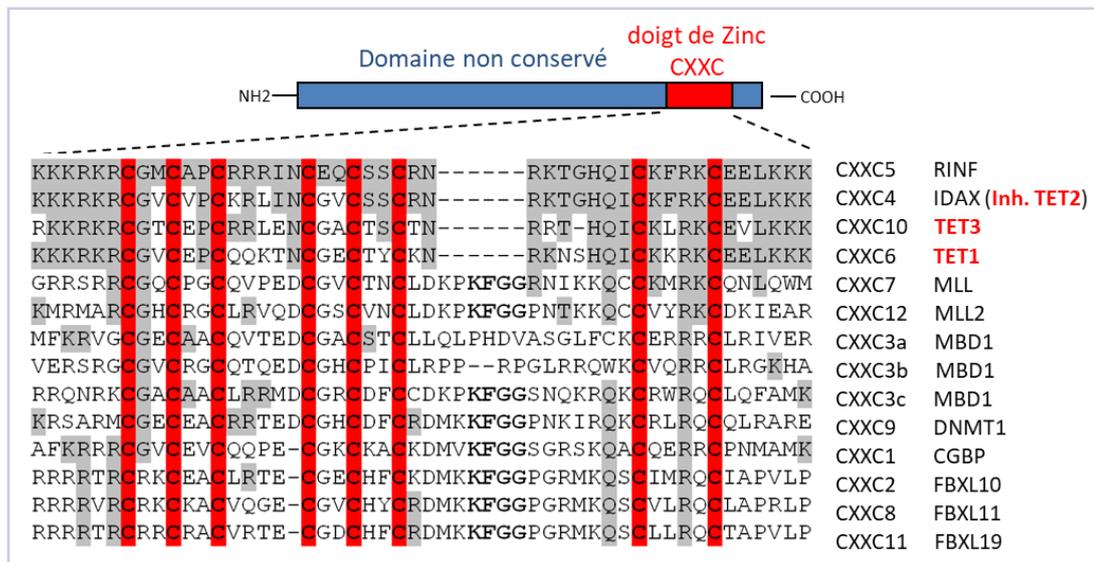


Figure 21: Le motif à doigt de zinc de type CXXC de la protéine RINF. Le doigt de Zinc de type CXXC est le seul domaine conservé dans la protéine RINF. Celui-ci est retrouvé dans onze autres protéines humaines. L'alignement de la séquence de ce motif entre les différents paralogues de RINF est ici représenté. Les acides aminés conservés sont en gris et les résidus cystéine sont en rouge. On observe que la majorité des protéines listées ont un rôle épigénétique. Le motif est particulièrement conservé avec les protéines impliquées dans le contrôle de l'hydroxyméthylation, en rouge. D'après (Pendino et al. 2009).

un CpG non méthylé (c'est le cas de DNMT3 et MBD1), ou bien de maintenir une méthylation lors de la réplication de l'ADN, permettant ainsi d'apporter une méthylation donnée sur le brin néosynthétisé (Rhee et al. 2002).

La famille des CXXC peut aussi être classée en 4 groupes selon leur homologie de structure ou par leur affinité de fixation sur les CpG comme présenté en **figure 22**. La **classe I** contient les doigts de zinc responsables de la méthylation de la lysine 4 de l’histone 3 (appelé pour la suite H3K4) et comprenant **CFP1** (Thomson et al. 2010), **MLL1** (Dou et al. 2006) et **MLL2** (FitzGerald et Diaz 1999). La **classe II** contient les enzymes responsables de la déméthylation de H3K36 tel que **KDM2A** (Tanaka et al. 2010) et **KDM2B** (Farcas et al. 2012). La **classe III** comprend les enzymes responsables de la méthylation de l’ADN telles que **DNMT1** (Rhee et al. 2002) et la **classe IV** contient les enzymes responsables de l’hydroxyméthylation de l’ADN, comme c’est le cas de **TET1** (Tahiliani et al. 2009), **TET3** (Gu et al 2011), **CXXC4** et **CXXC5** (Ko et al. 2013).

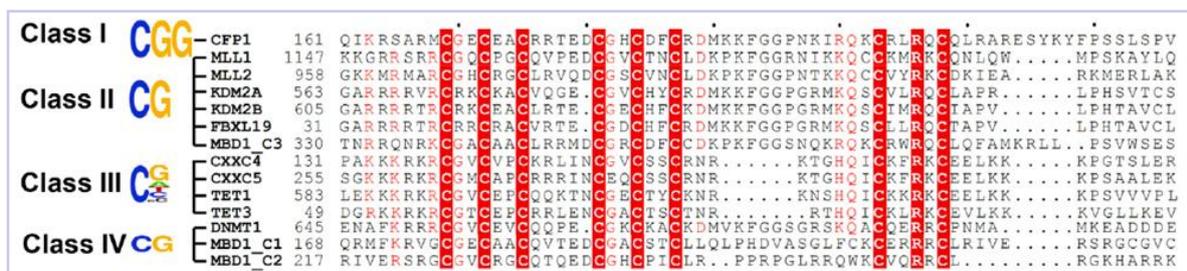


Figure 22: Classement des protéines à doigt de Zinc CXXC par leur motif d’affinité de liaison à l’ADN et par leur rôle. On observe une que les CXXC du groupe III sont en plus d’être capables de se lier aux CpG, sont également capables de se lier à d’autres motifs tels que les CpA, CpT, CpC et CpmC. D’après (Xu et al. 2018)

Les TET ont pour rôle la déméthylation de l'ADN dont le schéma mécanistique est détaillé en **figure 23**.

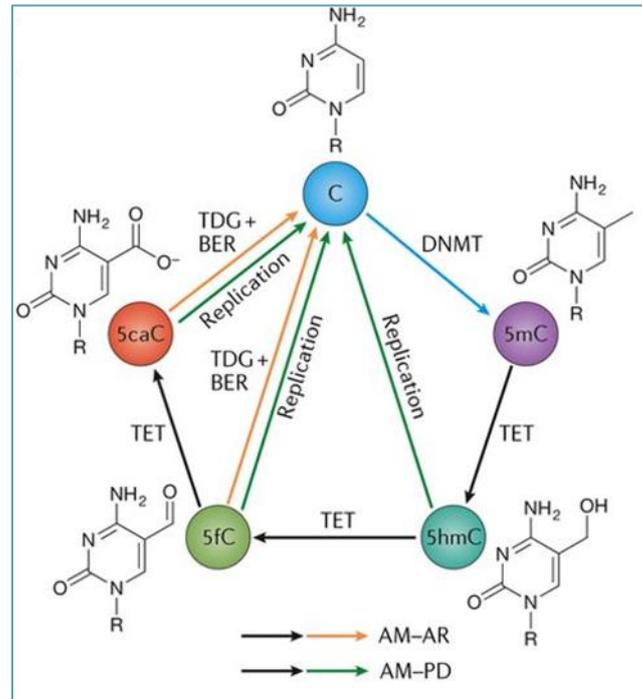


Figure 23: Schéma du cycle de déméthylation active de l'ADN. Le processus de **déméthylation de l'ADN** peut être réalisé par déméthylation **passive** ou **active**: Elle peut être passive lors de la réplication de l'ADN, dans le cas où le brin néosynthétisé n'est pas méthylé par la DNMT1. La méthylation n'est pas conservée et entraîne une perte de la méthylation au fur et à mesure des divisions cellulaires successives. Elle est rendue active par l'intermédiaire des TET (TET1, TET2, TET3) qui sont des enzymes tissu spécifiques possédant une activité méthylcytosine-dioxygénase, capable de catalyser la réaction de conversion des 5-méthylcytosines (5-mC) en 5-hydroxyméthylcytosines (5-hmC), puis en 5-formylcytosine (5-fC) et en 5-carboxylcytosine (5caC) pour obtenir la cytosine. Ces deux dernières modifications (5-fC et 5caC) sont réalisées par des enzymes appelées TDG pour thymine DNA glycosylase et permettent, de concert avec un mécanisme de *base excision repair* (BER), l'excision du 5-fC et 5caC. Ce dernier mécanisme est reconnu par ces enzymes comme un défaut de l'ADN (Hao Wu et al. 2014). TDG (*thymine DNA glycosylase*), BER (*base excision repair*), AM-AR (*active modification-active removal*), AM-PD (*active modification-passive dilution*). D'après (X. Wu et Zhang 2017)

Ainsi, TET1 est décrit dans la littérature comme très exprimée au cours du développement embryonnaire. TET1 est responsable de la déméthylation et du maintien de l'empreinte parentale lors du développement de l'embryon (Yamaguchi S 2013). Les *Knock Out* (KO) pour les gènes des TET ont pour effet d'amener un état d'hyperméthylation des promoteurs et *enhancer* de gènes créant ainsi des défauts de développement de l'embryon (chez la souris) (Dawlaty et al. 2014). TET3 a également un rôle lors du développement

embryonnaire, il est nécessaire au premier stade de la cellule œuf afin de démétyler les CpGs des promoteurs paternels de Oct4 et Nanog (Gu et al. 2011). *TET1* et *TET3* sont également exprimés dans le cerveau et l'invalidation de *TET1* mettrait en cause le développement neuronal, entraînant des défauts de comportement chez les souris adultes KO *TET1* (Andrii Rudenko et al. 2013). Des études montrent également le lien entre des maladies neurodégénératives et mentales où il est observé un défaut de méthylation/hydroxyméthylation des îlots CpG (A. Rudenko et Tsai 2014). Quant à *TET2*, il présente la particularité d'être dépourvu de domaine CXXC. Il est particulièrement exprimé dans les cellules hématopoïétiques et sa dérégulation entraîne des défauts d'hématopoïèse en favorisant l'expansion du compartiment souche. *TET2* est notamment retrouvé muté dans nombre de cancers du sang, leucémie et myélodysplasies en favorisant le plus souvent une expansion des clones leucémiques (Delhommeau et al. 2009).

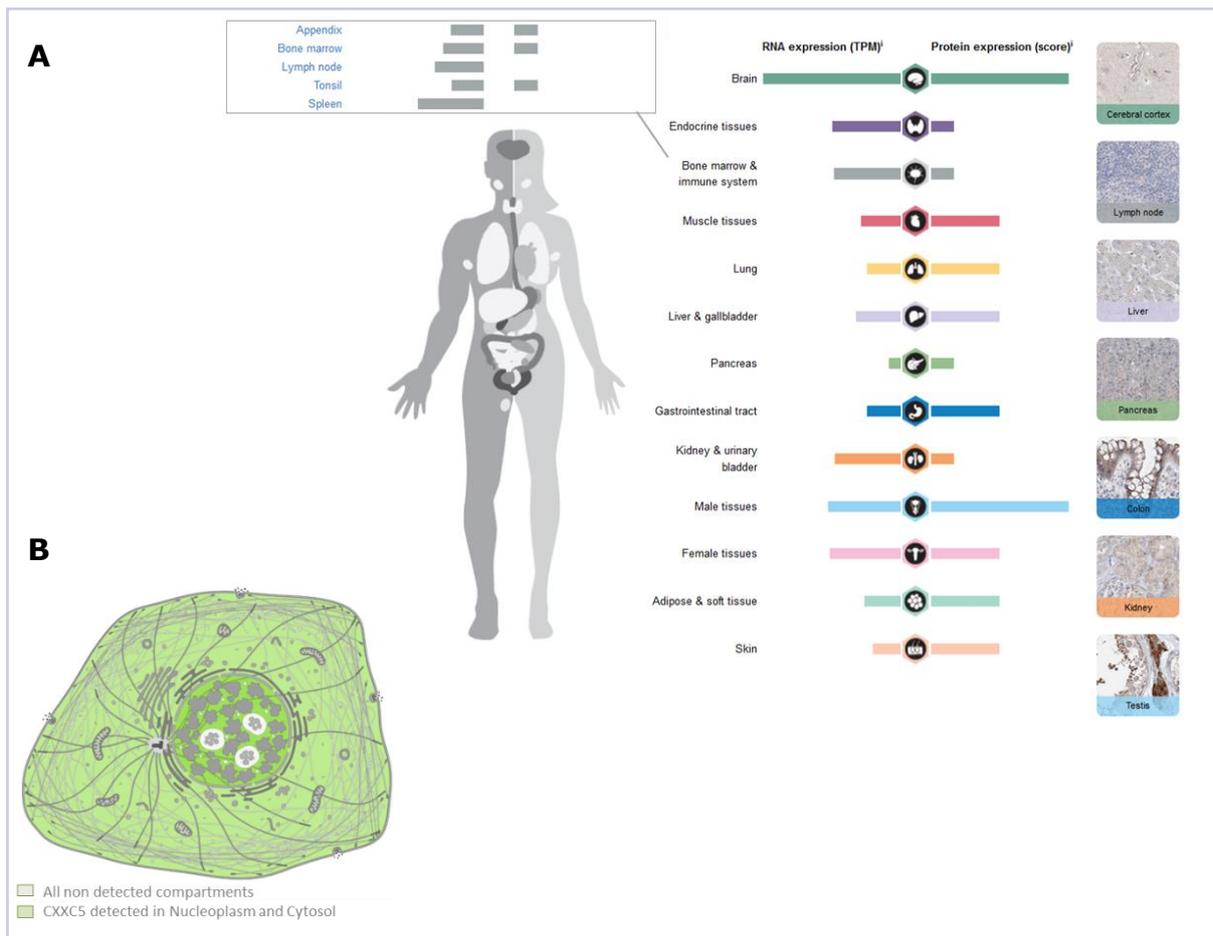
Plus récemment, des études ont mis en évidence le rôle des TET lors de l'érythropoïèse humaine (H. Yan et al. 2017). Bien que *TET1* ne soit pas exprimé au cours de l'érythropoïèse, leur travaux basés sur des expériences de perte d'expression de *TET2* et *TET3* dans des CSPH (CD34⁺) ont montré que *TET3* avait un impact sur l'érythropoïèse terminale, en augmentant le taux d'apoptose ainsi que le processus d'énucléation des érythrocytes. La perte de *TET2*, de son côté, a pour effet d'augmenter la prolifération des progéniteurs érythroïdes. De façon plus surprenante, la perte de ces TET (*TET2* et *TET3*) n'influerait pas sur le niveau de 5-mC global du génome. Un article récent montre également l'importance de *Tet2* et *Tet3* dans l'érythropoïèse murine. Par invalidation de *Tet2*, *Tet3* ou *Tet2/Tet3* (dont la délétion est inducible) les auteurs démontrent que ces souris ont une anémie dans les premières semaines qui est compensée par la suite, hormis pour le double KO *Tet2/Tet3* qui souffre d'une anémie chronique. Ces trois souris développent des pathologies leucémiques par la suite, lors du vieillissement (Swaminathan et al. 2017, preprint).

Dans l'article de Ko M *et al.* de 2013, il a été suggéré que CXXC5 et CXXC4 avaient un rôle similaire dans les cellules ES, celui d'inhiber *TET2*, par dégradation *via* la caspase 3 (Ko et al. 2013). Les TET ayant pour rôle la déméthylation de l'ADN (en catalysant la 5-mC en 5-hmC), CXXC5 aurait donc pour rôle d'empêcher cette déméthylation et donc de maintenir la 5-mC. Cependant, ces expériences ont été réalisées à partir de protéines étiquetées en N-ter, dont nous ignorons l'effet sur les fonctions endogènes de la protéine.

Un article plus récent suggère que CXXC5 recrute TET2 pour démétyler le promoteur de *Irf7* dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) et permet la production de l'IFN en réponse à une infection virale. Dans ce contexte cellulaire, CXXC5 et TET2 seraient donc des partenaires d'activation de la transcription. Ces deux types d'étude ayant été réalisées chez la souris dans des contextes cellulaires différents, dans des cellules souches embryonnaires (ESC) et l'autre dans des cellules de l'immunité, il est possible que CXXC5 ait un rôle ambivalent même lorsque sa localisation est nucléaire.

4.4. Expression du gène CXXC5

Depuis la découverte de CXXC5, les premiers articles de 2009 montrent une expression forte de la protéine humaine dans les cellules souches hématopoïétiques (CD34⁺), mais aussi dans le placenta, le rein et le cœur. En revanche, il serait moins exprimé dans le pancréas et les ovaires (Pendino et al. 2009). A l'ère du *big data*, les données de microarray, RNA-seq et protéomiques sont des données communes et accessibles permettant d'avoir une idée précise des variabilités d'expression entre des tissus spécifiques. D'autres consortiums ont fait vœu de conforter ces expressions et de valider les anticorps proposés dans le commerce *via* des banques de tissus sains, malins et lignées cellulaires (double screen entrepris par ProteinAtlas)(Uhlén et al. 2005; Thul et al. 2017)⁶. Selon ce site, la location de CXXC5 serait aussi bien nucléaire que cytoplasmique, et cette protéine serait exprimée de façon ubiquitaire.



⁶ <https://www.proteinatlas.org/>
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000171604-CXXC5/cell>

Figure 24: Expression de RINF dans différents tissus de l'organisme. Il est rapporté que RINF semble être présent et détecté aussi bien au niveau de son expression ARN que protéique dans la plupart des tissus. Il semblerait que suivant le contexte cellulaire l'expression de RINF serait essentiellement nucléaire bien qu'il soit reporté une expression cytoplasmique dans certains tissus. D'après *proteinatlas.org*

4.5. CXXC5, également appelé RINF pour *retinoid inducible nuclear factor*

Comme suggéré par le motif RARE (*retinoic acid responsive element*) en amont du TSS de CXXC5, ce gène est directement régulé par les rétinoïdes. Cette protéine, dont le gène a d'ailleurs été mis en évidence lors d'un microarray réalisé dans une lignée de Leucémie Aiguë Promyélocytaire (LAP), la lignée NB4, est bien induite par l'ATRA dans les cellules primaires de patients souffrant de LAP (Pendino et al. 2009). Après ajout de rétinoïdes, CXXC5 est induit précocement (dès 1h30) et les cellules NB4 normalement bloquées au stade de promyélocytes se différencient en granulocytes neutrophiles. Dans cet article, le mécanisme d'action par lequel CXXC5 (RINF) participerait à la différenciation des NB4 n'est pas exploré. Cependant, RINF serait nécessaire à la granulopoïèse puisqu'une approche lentivirale ciblant son expression montre que sa perte d'expression (*via* un shARN) empêcherait la différenciation terminale des NB4 induite par l'ATRA. De plus, la surexpression de RINF dans ces lignées permettrait d'abaisser le seuil des doses requises d'ATRA pour déclencher la différenciation des NB4 (donnée non publiées).

4.6. RINF, un inhibiteur de la voie Wnt/ β -caténine

Peu de mécanismes d'action de RINF sont décrits à l'heure actuelle. Depuis 2009, le mode d'action de RINF le plus souvent proposé dans la littérature est son premier rôle décrit comme inhibiteur de la voie Wnt/ β -caténine. Cette voie de signalisation est importante notamment pendant l'embryogenèse (Steinhart et Angers 2018) et le cancer (Polakis 2000).

La voie Wnt est activée par liaison de l'effecteur Wnt au récepteur transmembranaire Frizzled (Fz). Ce même récepteur va pouvoir s'associer à une autre protéine transmembranaire LRP, (LDL(*Low-Density Lipoprotein*)-related protein). Ce complexe permet de fixer DVL

(*Disheveled*) qui à son tour va recruter une protéine kinase GSK3 (Glycogensynthetase kinase) capable de phosphoryler la partie intracellulaire de LRP et de déphosphoryler la β -caténine. Cette déphosphorylation de la β -caténine empêche l'ubiquitination de celle-ci qui ne peut plus être dégradée par le protéasome. La β -caténine étant un facteur de transcription, elle peut se délocaliser dans le noyau et activer des gènes spécifiques de la transcription. La **figure 25** présente un schéma du mécanisme d'action de la voie Wnt/ β -caténine.

Les travaux d'Andersson *et al.* ont montré que RINF interagit négativement avec cette voie de signalisation en se liant à DVL, mettant en avant une interaction protéine/protéine (RINF/DVL) dans le cytoplasme, empêchant le recrutement de GSK3, maintenant la dégradation de la β -caténine par le protéasome dans une lignée humaine HEK293 (pour *Human embryonic kidney 293*) et dans une lignée de cellule souche neurale. Depuis, principalement chez la souris mais aussi chez l'humain (lignées cellulaires), d'autres travaux ont montré une interaction entre RINF et DVL dont l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine impacte la différenciation des ostéoblastes, ralentissant le processus d'ossification (Kim HY 2015)(H.-Y. Kim et al. 2016). Dans la souris KO *Rinf*, des travaux ont aussi mis en évidence une diminution de la différenciation des oligodendrocytes et du processus de myélinisation des axones dans le cerveau. Les souris invalidées pour *Rinf* souffrent d'un défaut de conduction du fait de la structure des gaines de myéline (M.-Y. Kim et al. 2016).

L'activation de la voie Wnt/ β -caténine par l'inhibition, le ciblage de RINF ou de son complexe RINF/DVL accélérerait des processus de cicatrisation et de régénération de la peau (S.-H. Lee et al. 2015) et des cheveux et poils (S.-H. Lee et al. 2017) *via* l'expansion des kératinocytes, l'augmentation de production du collagène 14 des fibroblastes et l'augmentation de la division des follicules pileux.

Par l'intérêt évident de cibler RINF pour favoriser des processus de différenciation (repousse du cheveu, cicatrisation de la peau, différenciation osseuse), des groupes de recherche ont également entrepris de cibler le complexe d'interaction RINF/DVL *via* la conception d'un peptide inhibiteur. Depuis 2016, un peptide est à l'essai dans des thérapies contre l'ostéoporose (H.-Y. Kim et al. 2016). La conception de logiciel de prédiction de molécules inhibitrices de ce complexe est toujours d'actualité (Songling Ma et al. 2018) et a même amené des équipes à faire des études de cristallographie du complexe RINF/DVL (I. Lee et al. 2017).

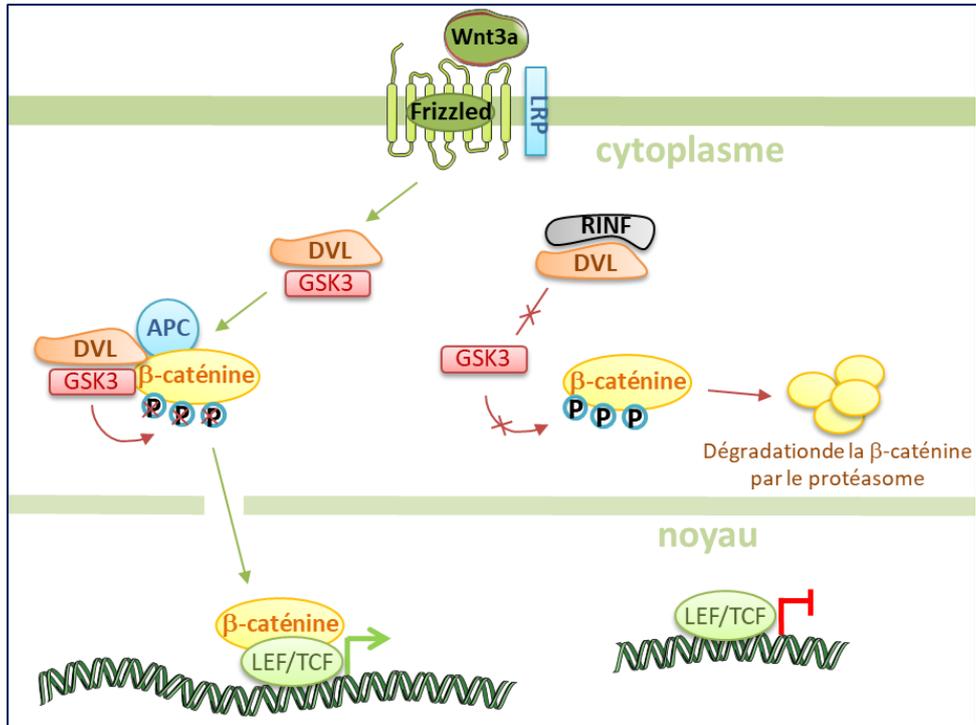


Figure 25: Schéma proposé du mécanisme d'action de RINF sur la voie Wnt/β-caténine. Il a été mis en évidence une interaction entre RINF et DVL, empêchant la liaison de DVL avec GSK3. Cette action entraîne la dégradation de la β-caténine par le protéasome et empêche ainsi la transcription des gènes cibles de la voie Wnt/β-caténine.

4.7. RINF et voie de signalisation du TGF- β

D'autres travaux montrent que RINF serait également impliqué dans la voie de signalisation de la superfamille du TGF- β , notamment comme cible du BMP4 dans les cellules souches neurales (Andersson et al. 2009), ainsi que nécessaire pour le développement cardiaque du poisson zèbre (*zebrafish*) (Peng et al. 2016). Le poisson zèbre étant très différent de l'homme, les taux de conservation des protéines sont élevés (95-97%), ils mettent en évidence ici une interaction protéique entre le motif en doigt de zinc CXXC et SMAD2/SMAD3 (confirmée par mutagenèse dirigée sur le motif CXXC).

RINF a aussi été proposé comme activateur de la voie du TGF- β dans les carcinomes hépatiques, permettant l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction en apoptose (X. Yan et al. 2018). Cependant, quelques ambiguïtés persistent dans l'interprétation de leurs résultats, notamment le fait que la perte de *RINF* (*via* shRINF) sensibilise la lignée Hep3B au TGF- β , et qu'ils considèrent que RINF soit un activateur du TGF- β . Ils montrent ensuite que l'ajout de TGF- β augmente l'expression d'un vecteur luciférase sur le promoteur de RINF dans la lignée cellulaire Hep3B. Bien que ces résultats semblent se contredire, ils pourraient s'expliquer par un rôle non intuitif comme une boucle de rétro-contrôle dans laquelle RINF serait activateur et se réprimerait pour contrôler sa propre expression. Ils suggèrent également que RINF se lierait à HDAC1, faisant l'un et l'autre un partenaire transcriptionnel.

4.7.1. *RINF est impliqué dans la reproduction*

Les œstrogènes modulent *RINF* dans des lignées de cancer du sein (Yaşar, Ayaz, et Muyan 2016). En effet, en plus de posséder un motif *RARE* en amont de son site de transcription, RINF possède également un motif de réponse aux œstrogènes ERE (*Estrogen Responsive Element*).

Il a été suggéré que la diminution de l'expression de RINF dans le tissu de la *corona radiata* était associée à une faible réserve ovarienne chez la femme (May-Panloup 2012). *RINF* est retrouvé surexprimé dans les tissus ovariens de chèvre capable de *polycoitus* (grossesse à gestation multiple) (X. P. An et al. 2012). Bien que ce ne soit que des corrélations, les faibles expressions de *RINF* dans le tissu ovarien sont associées à des *monocoitus*.

Il a été suggéré que RINF interagissait avec FOXL2, un gène impliqué dans les pathologies liées à des défauts dans la régulation ovarienne ainsi que lors du développement embryonnaire (développement crâniotaciale). CXXC4, de par son homologie structurelle, semble également avoir un mécanisme d'action en commun avec FOXL2.

Bien que ce ne sont que des études corrélatives indépendantes, l'ensemble de ces articles confortent le fait que RINF ait un rôle dans le processus de reproduction, étant très exprimé dans les organes reproducteurs et modulé par les œstrogènes.

4.8. L'ambiguïté de RINF avec les mécanismes d'apoptose

L'apoptose est un processus d'induction de mort cellulaire. Il est utilisé par la plupart des cellules lorsqu'un dysfonctionnement "irréversible" survient. Il est aussi utilisé lors du développement embryonnaire pour la morphogénèse des tissus comme pour façonner les doigts, le cerveau, la bouche, les yeux, ... (Jacobson, Weil, et Raff 1997). Certains lymphocytes T de l'immunité peuvent induire l'apoptose des cellules non reconnues par le système immunitaire ou reconnues comme dégénérées (*via* FasL/Fas). Enfin, les mécanismes de résistance à l'apoptose sont très étudiés notamment dans le cancer comme c'est l'une des propriétés intrinsèques des cellules cancéreuses (Hanahan et Weinberg 2011).

Il a été mis en évidence un rôle de RINF dans des mécanismes d'apoptose, suggérant que dans certains tissus, il pourrait être pro-apoptotique. Ce mécanisme pourrait être dépendant de P53. Il est par exemple suggéré que RINF participe à l'activation transcriptionnelle de P53 et de la phosphorylation de sa protéine, permettant d'induire l'arrêt du cycle cellulaire après ajout d'étoposide (empêche l'entrée en mitose par inhibition de la topo-isomérase chargée de ressouder les brins d'ADN). L'absence de RINF et la présence d'étoposide ne permettrait pas l'accumulation de P53 dans le cytoplasme ni le recrutement d'ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated protein-kinase*) au niveau de la chromatine endommagée des lignées TK6 (*lymphoblastoïdes cells*) (M. Zhang et al. 2009b). Il en serait de même dans les leucémies aiguës myéloïdes, dans lesquelles l'absence de RINF empêcherait l'induction de P53 induite par l'irradiation et les dommages à l'ADN (Kühnl et al. 2015).

Comme déjà énoncé, RINF serait un partenaire de FOXL2. Bien qu'agissant comme répresseur de l'activité transcriptionnelle de FOXL2 (montré par test luciférase) (L'Hote 2012),

sa co-surexpression avec FOXL2 augmenterait l'apoptose induite (et visualisée *via* marquage à l'Iodure de Propidium et Annexine V) dans une lignée cellulaire KGN dérivée d'une tumeur de la granulosa (tissu ovarien).

RINF a également un rôle pro-apoptotique dans des sarcomes, notamment des cancers de la gaine des nerfs périphériques (appelés MPNST pour *Malignant peripheral nerve sheath tumors*) (Cui et al. 2017). Il a été ici mis en évidence dans des lignées de fibrome neurales que KANK1, un régulateur du cytosquelette, régule *RINF* transcriptionnellement. Par des expériences de pertes et gains de fonction ils ont ensuite montré que RINF induit l'apoptose d'une lignée cellulaire S462 dérivée de MPNST. De même, une approche ARN interférence de RINF rétablit la prolifération cellulaire de cette lignée en diminuant l'apoptose.

Son rôle pro-apoptotique est encore suggéré dans des lignées de carcinomes hépatiques (Hep3B) (X. Yan et al. 2018), par des expériences de pertes de fonction de RINF, l'apoptose est diminuée, ce qui a pour effet de rétablir la prolifération cellulaire de ces lignées. De cette dernière expérience RINF est identifié comme une cible du TGF- β .

Cependant, RINF aurait clairement une fonction anti-apoptotique et protumorale (dans les lignées Hep3b et SMMC-7721) selon une autre étude réalisée la même année et dans une même lignée cellulaire (Tan et al. 2018).

Dans ces derniers articles décrivant le mode d'action de RINF dans certains tissus et cancers, RINF aurait le plus souvent un rôle pro-apoptotique, faisant de lui un potentiel gène **suppresseur de tumeur**.

4.9. *RINF* est dérégulé dans de nombreux cancers

Bien que cela puisse paraître surprenant, la séquence codante du gène *CXXC5* est rarement mutée dans les cancers. De très rares microdélétions du gène *RINF* ont été décrites dans des cas de SMD (Murati et al. 2009) (Gelsi B 2009).

Toutefois, *CXXC5* est dérégulé dans de nombreux cancers: que ce soit les cancers du sein, de la peau (mélanome), de la thyroïde (Knappskog 2010), de la prostate (Bettin A 2015)

(Benedetti et al. 2017) (Devaney et al. 2013) et dans les cancers gastriques (W. Sui et al. 2017). *RINF* est également dérégulé dans les cancers hématopoiétiques, LAM (Kuhnl et al. 2015)(Astori et al. 2013), SMD (Pendino et al. 2009) (Treppendahl et al. 2013) (Stoddart et al. 2016) (Rinke et al. 2017) ou encore CMML (Gelsi B 2009).

Le rôle de *RINF* étant encore peu connu dans le cancer, sa forte expression s'avère être de mauvais pronostic dans les cancers de la prostate (Bettin, Reyes, et Reyes 2016), du sein, (Knappskog et al. 2011). Des travaux de l'équipe ont également montré que l'expression de *RINF* corrélait négativement avec la survie dans les LAM (Astori et al. 2013) et, de plus, que la perte d'expression de *RINF* (par stratégie ARN interférence) sensibilisait les cellules d'une lignée K562 à la chimiothérapie (doxorubicine et légalidomide). Les cellules primaires de patients LAM présentant une faible expression de *RINF* mouraient plus rapidement lors de leur mise en culture et répondaient différemment à la chimiothérapie (lenalidomide). Appuyant cette hypothèse, les travaux de Kuhnl et al. ont montré que les blastes des patients LAM exprimant faiblement *RINF* sont de meilleur pronostic, et moins résistants à l'apoptose induite par la chimiothérapie conventionnelle (Kuhnl et al. 2015).

Son expression est également retrouvée diminuée dans le cancer de la prostate *via* hyperméthylation de son promoteur résultant de l'inactivation de la transcription du gène (Devaney et al. 2013). Il est également retrouvé diminué dans les SMD 5q-, pathologie caractérisée par une anémie (Stoddart A 2015) (Rinke et al. 2017) (Gelsi-Boyer et al. 2009).

Il semble difficile de faire la part de la contribution de *RINF* à ces pathologies, tantôt étant identifié comme un gène suppresseur de tumeur, tantôt comme oncogène. L'ensemble de ces travaux suggère que *RINF* serait impliqué dans le processus de cancérogénèse, nous ne savons toutefois pas le mécanisme d'action ni le rôle exact de cette protéine dans le cancer.

Pour les tumeurs solides, si la forte expression de *RINF* est généralement corrélée à un mauvais pronostic, nous ne savons toujours pas quelles sont les cellules de l'écosystème tumoral qui l'expriment le plus (cellules cancéreuses, stromales, infiltrat immunitaire...). *RINF* étant fortement exprimé dans certaines cellules du système immunitaire (Lymphocytes B, NK et pDC), et sa fonction ayant récemment été démontrée comme nécessaire à l'immunité anti-virale, il est possible que *RINF* participe aussi à la fonctionnalité anti-tumorale de ces cellules.

Justification du projet de recherche

Le gène CXXC5 (alias RINF, *Retinoid-Inducible Nuclear Factor*), a été découvert en 2009 comme une cible directe des rétinoïdes nécessaire à la granulopoïèse. En effet, des expériences d'inactivation par ARN interférence ont démontré que l'expression de ce facteur était essentielle à la différenciation granulocytaire terminale des cellules hématopoïétiques aussi bien normales (progéniteurs hématopoïétiques humains CD34⁺ cultivés en présence de G-CSF) que leucémiques (lignée NB4 traitée par l'ATRA, Acide Rétinoïque tout-*trans*). Toutefois, la contribution fonctionnelle de RINF sur la maturation, voire dans l'engagement des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques humains vers d'autres lignages n'avait pas été déterminée.

Au niveau moléculaire ce gène code pour un facteur nucléaire renommé RINF par l'équipe. RINF s'associe à la chromatine de par son motif en doigt de zinc (CXXC), lui permettant de se lier aux îlots CpG. Ce motif CXXC est retrouvé très conservé parmi des facteurs épigénétiques tels que TET1, TET3 et IDAX (CXXC4, précédemment décrit comme inhibiteur de TET2). Ces protéines sont connues comme étant impliquées dans le processus d'hydroxyméthylation de l'ADN, une étape intermédiaire et nécessaire à la déméthylation de celle-ci. Nos résultats et ceux de la littérature suggèrent que RINF aurait un rôle semblable à CXXC4, pouvant ainsi interférer avec l'activité des enzymes TET ou de leur transcription.

Bien que de nombreuses études ont montré un rôle de RINF en tant qu'inhibiteur de la voie Wnt/ β -caténine avec une localisation cytoplasmique (bien que possédant un motif NLS) ; dans l'hématopoïèse et dans d'autres tissus, RINF possède une expression nucléaire mettant en avant un mécanisme d'action différent pouvant aussi bien être complémentaire.

En accord avec la localisation de son gène en 5q31.2, une région retrouvée fréquemment délétée (CDR) chez les patients del(5q), il a été suggéré que la perte d'expression de RINF pouvait participer au processus de développement (pré)leucémique des SMD (Syndrome Myélodysplasique), une pathologie caractérisée par une dysérythropoïèse.

L'objectif initial de mon projet de thèse était **(1)** d'évaluer la contribution de RINF *in vitro* au cours de l'érythropoïèse humaine normale, **(2)**, *in vivo* au cours de l'hématopoïèse murine et **(3)** de définir son mode d'action moléculaire, notamment par la recherche de ses cibles transcriptionnelles, suggéré par son motif de liaison à l'ADN.

Résultats

Article 1

CXXC5 (RINF) loss-of-expression accelerates human erythroid differentiation in a TGF- β and SMAD7-dependent manner.

Audrey Astori,¹⁻⁵# **Gabriel Matherat**,¹⁻⁴# Emilie-Fleur Gautier,^{1,4} Didier Surdez,⁶ Yaël Zermati,^{1,4} Sakina Zaidi,⁶ Vincent Feuillet,¹⁻³ Hélène Baski,^{1,4} Amir Kadi,^{1,4} Agnès Le Bon,¹⁻³ Frédérique Verdier,^{1,4} Evelyne Lauret,^{1,4} Eric Nguyen,^{3,5} Olivier Delattre,⁶ Valérie Dumaine,⁷ Carine Lefèvre,^{1,4} Michaela Fontenay,^{1,4} Øystein Bruserud,^{8,9} Evelyne Ségal-Bendirdjian,^{3,5} Isabelle Dusanter-Fourt,^{1,4} Patrick Mayeux,^{1,4} and Frédéric Pendino.¹⁻⁵

¹Inserm, U1016, Institut Cochin, Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, F-75014, Paris, France; ²CNRS, UMR8104, F-75014, Paris, France; ³Universit   Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; ⁴Department of Development, Reproduction, and Cancer, Institut Cochin, F-75014, Paris, France; ⁵Inserm, U1007, Centre Universitaire des Saints-Pères, F-75006, Paris, France; ⁶Institut Curie, PSL Research University, Inserm U830, Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, SIREDO Oncology Center, 26 rue d'Ulm, F-75005 Paris, France; ⁷Service de Chirurgie Orthop  dique, AP-HP, Hôpital Cochin, Paris, France. ⁸Section for Hematology, Department of Clinical Science, University of Bergen, Norway; ⁹Department of Medicine, Haukeland University Hospital; Bergen, Norway.

These two authors contributed equally to this work.

Short title for the running head: *CXXC5 loss-of-function accelerates erythropoiesis*

Text word count: **3949** Abstract word count: **206**

Number of tables: **0** number of figures: **7**, supplemental methods: **1**, supplemental tables: **2**, supplemental figures: **5**, number of references: **59**, number of pages: **24**

Correspondence: Frédéric Pendino, PhD
Institut COCHIN,
Inserm U1016 - CNRS 8104 - Universit   Paris Descartes UMR-S1016
Bâtiment Gustave Roussy (7  me étage)
27, rue du Faubourg Saint-Jacques
75014 PARIS, FRANCE
Phone: +33 1 40 51 64 03 Fax: +33 1 40 51 65 35
Email: frederic.pendino@inserm.fr

Scientific Category: *Red cells, Iron, and Erythropoiesis.*

Key points:

- Retinoid-Induced Nuclear Factor (RINF) binds to the promoter of *SMAD7* and upregulates its gene expression in a transcriptional manner
- *CXXC5 loss-of-function* downregulates *SMAD7* and sensitizes human erythroid progenitors to autocrine TGF- β -induced growth inhibition

Résumé de l'article 1

Le gène *RINF/CXXC5* localisé en 5q31 a été suggéré comme gène suppresseur de tumeur dans de nombreux cancers hématopoïétiques. Dans cet article nous avons évalué le rôle de *RINF* dans l'érythropoïèse.

- **L'expression de RINF module la cinétique de maturation érythroïde humaine**

Nos recherches ont permis de caractériser le profil d'expression protéique et ARNm de RINF au cours de la différenciation érythroïde (à partir de CD34⁺ normales, de sang de cordon et de moelle osseuse issues de donneurs non leucémiques). Ils démontrent que l'expression de RINF est forte dans les phases précoces de l'érythropoïèse (stades progéniteurs et proérythroblaste). Cette caractérisation, poursuivie ensuite en condition de perte d'expression de RINF (ARN interférence par shARN), dans les cellules primaires (CD34⁺) ont montré que sa perte, n'affectait pas la viabilité cellulaire, mais accélérail la cinétique de différenciation érythroïde et conduisait également à un **nombre plus faible d'érythrocytes générés**, impactant la capacité des progéniteurs à fournir **une érythropoïèse soutenue (voir aussi résultats supplémentaires, Figure S2)**.

Par la suite, des expériences de perte de fonction couplées à des tests clonogéniques en milieu semi-solide, réalisés à partir de cellules CD34⁺ normales ont mis en évidence que la perte d'expression de RINF amenait à la génération d'un plus grand nombre de colonies BFU-E ainsi qu'une diminution de la taille globale des colonies érythroïdes BFU-E formées, suggérant un impact tant sur la **prolifération** que sur la **différenciation**.

En parallèle, des expériences de perte et gain de fonction dans deux lignées érythroleucémiques **K562** et **UT7** ont démontré que **l'expression de RINF permettrait de moduler la cinétique d'hémoglobinisaiton de ces cellules**.

- **Identification du mécanisme d'action moléculaire**

La recherche de gènes cibles de RINF a été entreprise par une approche de puces-à-ADN (Puces HTA2.0, Affymetrix) dans les lignées érythroleucémiques K562 et UT7_{5.3} en condition de perte de fonction de RINF. Parmi les gènes les plus régulés par l'extinction de la protéine

RINF, *SMAD7*, un régulateur négatif de la **voie du TGF- β** , s'est avéré être un excellent gène candidat à éprouver fonctionnellement.

- **Validation de *SMAD7* comme cible transcriptionnelle de RINF dans les lignées érythroleucémiques et les cellules primaires**

Nous avons vérifié que ce gène était régulé par RINF dans les lignées K562 ainsi que dans les cellules primaires CD34⁺ de sang de cordon en montrant que la perte d'expression de RINF, toujours médiée par expérience d'ARN interférence, aboutissait à une perte d'expression de *SMAD7*. L'expression ectopique de RINF induit une augmentation de l'expression de *SMAD7* dans les lignées cellulaires K562.

Afin de déterminer s'il s'agissait d'un mécanisme transcriptionnel, direct ou indirect, de RINF sur *SMAD7* nous avons entrepris (en collaboration avec une équipe de l'institut Curie) une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) *via* un anticorps anti-RINF. Cette expérience nous a permis de démontrer un enrichissement de la région promotrice de *SMAD7* dans l'immuno-précipitat, mettant en évidence une **liaison de RINF au niveau du promoteur de *SMAD7***. Cette même expérience, renouvelée cette fois avec un anticorps anti-H3K4me3, a suggéré que le promoteur de *SMAD7* présentait une augmentation des marques d'activation transcriptionnelles dans les conditions surexprimant RINF. **L'ensemble de ces données ont démontré que RINF activait *SMAD7* de manière transcriptionnelle directe.**

Nous avons par la suite montré que **la surexpression de *SMAD7* dans les K562 empêchait l'accélération de l'hémoglobinisation** normalement induite par le shARN RINF. Ce résultat montre que l'effet de RINF sur la différenciation érythroïde dépend effectivement de *SMAD7*.

Ces résultats ont également été étoffés par des expériences effectuées sur des **cellules primaires** en culture, où l'utilisation d'un **inhibiteur du récepteur au TGF- β** empêche également **l'accélération de la maturation érythroïde** normalement induite par un shARN ciblant *RINF*.

L'ensemble de mes résultats mettent en évidence un nouveau mécanisme d'action de RINF dont la perte d'expression sensibiliserait les cellules au TGF- β , ce qui aurait pour conséquence de diminuer la capacité des progéniteurs à fournir une érythropoïèse soutenue.

Données supplémentaires de l'article 1

1. La perte de RINF sensibilise les progéniteurs érythroïdes à une sécrétion TGF- β autocrine, du moins en partie *via* la phosphorylation de SMAD2/3

Les résultats précédents de l'article ont montré que la perte de RINF par stratégie lentivirale induit une maturation plus rapide des érythroblastes primaires *via* la perte d'expression de *SMAD7*. Les autres membres de la superfamille du TGF- β , ainsi que les effecteurs principaux de la signalisation TGF β méritaient d'être analysés. Nous avons dans un premier temps recherché par l'intermédiaire d'une analyse protéomique réalisée au laboratoire (Gautier EF et al, 2016) les effecteurs du TGF- β exprimé au cours de la différenciation érythroïde. Il a ainsi été observé que le TGF- β 1 et son récepteur étaient les plus présentes au cours de la différenciation érythroïde, GDF15 étant exprimé seulement au stade orthochromatique (non montré). Nous avons ensuite analysé par immuno-détection l'expression des SMAD activés (phosphorylés) de la signalisation du TGF- β 1 (SMAD2 et SMAD3) entre le stade Prog2 (population riche en BFU-E et CFU-E) et ProE (au moment où la signalisation TGF- β 1 semble la plus active en protéomique) et en condition de perte de fonction de RINF dans des cellules primaires CD34⁺ induites en différenciation érythroïde (**Figure S1, ci-dessous**).

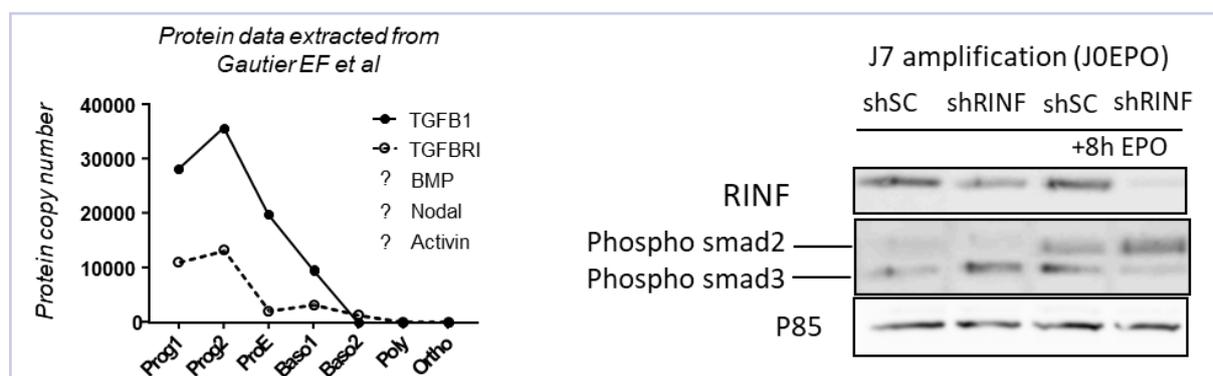


Figure S1: Mise en évidence des effecteurs de la voie du TGF- β et de la phosphorylation de SMAD2 et de SMAD3 au cours de l'érythropoïèse. Les données extraites des résultats de protéomiques réalisées par Gautier EF et al, 2016 décrivent l'expression de TGF- β 1, TGF β RI, BMP, Nodal et les activines au cours de la différenciation érythroïde *in vitro*. Les stades Prog1 et Prog2 correspondent respectivement à des populations enrichies en BFU-E et CFU-E. Le stade Orthochromatique correspond à l'érythrocyte acidophile. On observe que seul TGF- β 1 et son

récepteur seraient présents dans les érythroblastes, les autres membres de la superfamille (BMP, Nodal et activin) n'étaient ici pas détectables hormis GDF15 au stade Ortho (**B**). Des cellules CD34 primaires de sang de cordon ont été transduites par shARN RINF, une expérience d'immunoempreinte a été réalisée (après la phase d'amplification des progéniteurs érythroïdes) et montre l'expression de RINF et de phospho SMAD2/3 à J7 et J7 +8h EPO. Cette expérience montre une accélération de la p-SMAD2 et p-SMAD3 dans les conditions shARN-RINF.

2. La perte de RINF au cours de la différenciation érythroïde impacte la production finale d'érythrocytes de façon dépendante du TGF- β .

Précédemment, les résultats de l'article ont démontré que la perte de RINF sensibilisait les cellules érythroïdes à une signalisation TGF- β autocrine, conduisant à une maturation plus rapide de ces cellules et à une moindre production d'érythrocytes (ce qui pouvait aussi être visualisé par des colonies BFU-E plus petites dans la Figure 3 de l'article 1). Nous avons voulu caractériser cette sensibilité au TGF- β des progéniteurs érythroïdes en condition ou non de perte de *RINF* (médiée par une stratégie lentivirale, shARN). Ainsi, par des doses croissantes de TGF- β 1 (de 0.1ng/mL, 0.5 et 2.5ng/mL) ajouté au début de la phase de différenciation des progéniteurs (à J7 d'amplification), nous montrons que la perte de RINF sensibilise grandement la différenciation érythroïde (en particulier aux doses les plus faibles) et aboutit à jusqu'à 4 fois moins d'érythrocytes (à 0.1ng/mL de TGF- β 1) (**Figure S2, flèche verte**).

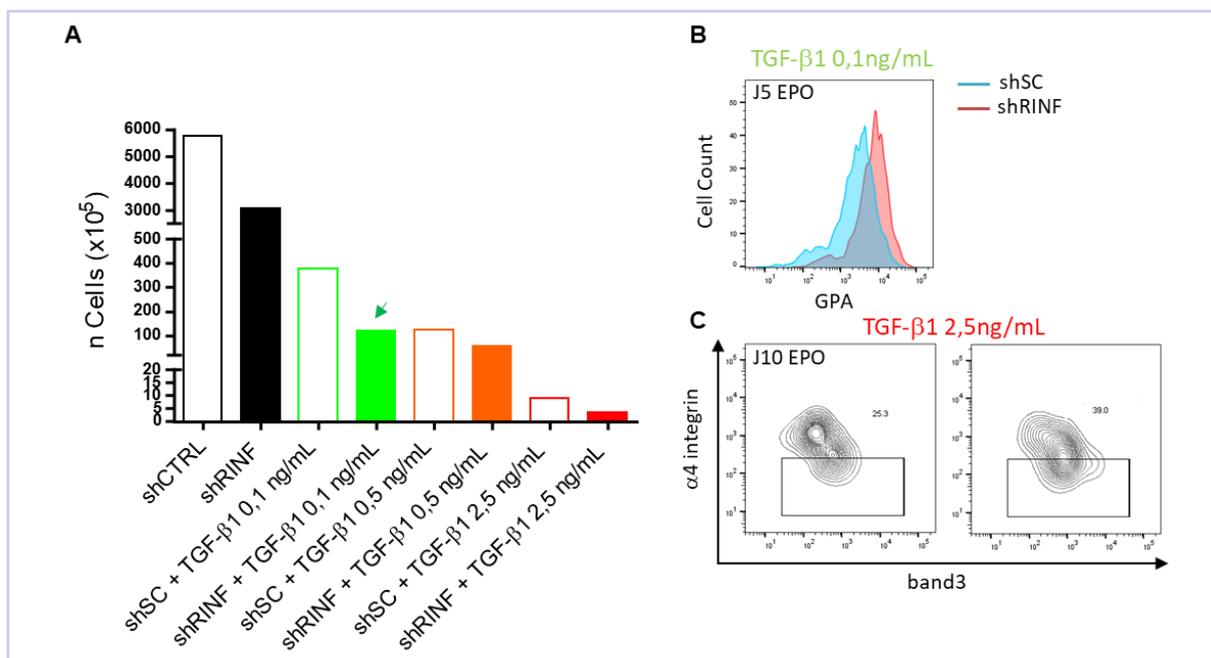


Figure S2: La perte de RINF sensibilise les progéniteurs érythroïdes au TGF- β 1 même à de très faibles doses. Après tri CD34⁺ de progéniteurs de sang de cordon, transduction par un shARN RINF/Scramble puis tri sur la base de l'expression de la GFP, les cellules ont été mises en culture liquide, après amplification des progéniteurs la différenciation est déclenchée par l'EPO à J7 et des doses croissantes de TGF- β 1 sont ajoutées (de 0.1 à 2.5ng/mL), les cellules sont dénombrées tous les deux jours et suivies en cytométrie jusqu'à la fin de la différenciation érythroïde (stade érythroblaste acidophile). L'histogramme de gauche (**A**) représente le nombre total d'érythrocytes générés au cours de la différenciation. Le panel de droite (**B et C**) permet la visualisation en cytométrie en flux de la maturation érythroïde *via* la GPA ou la Band3 additionnée de l' α 4 intégrine.

3. *RINF* et *SMAD7* corrént dans les CD34 de patients sains et les patients SMD 5q-.

Nous avons montré dans un résultat précédent (**Article 1, Figure 7**) que la perte de *RINF* médiée par une approche lentivirale dans les CD34⁺ de cellules primaires était accompagnée d'une diminution d'expression de *SMAD7*. Nous avons par la suite cherché à savoir si dans les CD34⁺ de moelle osseuse, les expressions de *RINF* et de *SMAD7* étaient corrélées. Cela est bien le cas, aussi bien dans les cellules saines (donneurs contrôles) que dans les cellules de patients souffrant de pathologies de SMD avec délétion 5q- (isolée ou non), malgré une perte d'expression des deux gènes *RINF* et *SMAD7*, comme cela est attendu dans cette pathologie (**Figure S3**).

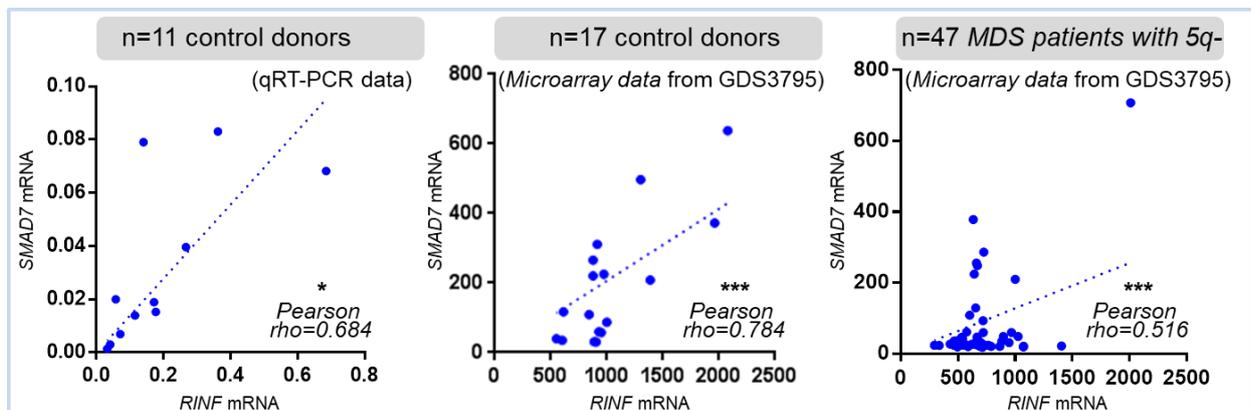


Figure S3: Corrélation de *RINF* et de *SMAD7* dans des cellules CD34⁺ de moelle osseuse de contrôles ou bien souffrant de SMD avec délétion 5q- (isolée ou non). (A). Les niveaux d'expression des transcrits *RINF* et de *SMAD7* ont été évalués par RT-PCR quantitative (en temps réel) à partir d'ARN de cellules triées CD34⁺ de Moelle osseuse provenant de donneurs sains (prothèse totale de hanche). Leur expression relative est normalisée à l'expression de deux gènes de référence (les unités relatives sont donc arbitraires sur les deux axes). (B) Des données d'expression (unités arbitraires) de l'ARNm de *RINF* et *SMAD7* ont été extraites de *microarray* accessibles en ligne (GSE19429 de Pellagatti *et al*, 2010, aussi accessibles GDS3795). Pour l'étude de corrélation des deux transcrits *RINF* et *SMAD7*, le test de Pearson a été réalisé avec le logiciel Graphpad Prism 7.0. Les P-values se sont avérées significatives pour les trois conditions (de gauche à droite, P=0.020, P=0.0002 et P=0.0002).

Conclusion

La protéine RINF/CXXC5, initialement mise en évidence comme étant requise pour la granulopoïèse, aurait donc un rôle positif sur l'expansion cellulaire au cours de l'érythropoïèse.

Nous avons, (i), caractérisé le profil d'expression ARN et protéique de RINF au cours de la différenciation érythroïde de cellules hématopoïétiques primaires CD34+ (de sang de cordon et de MO), montré, (ii), par des expériences de perte et gain de fonction (cellules de lignées hématopoïétiques) que l'expression de RINF modulait la cinétique d'hémoglobination de ces cellules, montré, (iii), par des expériences de perte de fonction dans des cellules hématopoïétiques primaires CD34+ (de sang de cordon) que l'absence de RINF induisait une maturation plus rapide des progéniteurs érythroïdes, aboutissant à une moindre production finale d'érythrocytes. Et enfin, **nous avons mis à jour, (iv), un mécanisme d'action original par lequel *SMAD7* serait une cible transcriptionnelle directe de RINF et modulerait la cinétique de différenciation érythroïde via une signalisation TGF- β autocrine.**

Partie 2

Etude phénotypique d'un modèle murin invalidé pour *Rinf/Cxxc5*.

Les travaux antérieurs de l'équipe d'accueil suggéraient une fonction hématopoïétique importante du facteur nucléaire RINF (du moins dans la granulopoïèse et la leucémie aiguë myéloïde). Afin de mieux appréhender la véritable importance fonctionnelle de ce facteur *in vivo*, et notamment au cours de l'hématopoïèse, deux modèles murins ont été développés dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut Clinique de la Souris (IGBMC, Illkirch): un KO constitutif et un KO conditionnel (souris floxée et croisée avec le système vav-CRE), afin d'invalider spécifiquement le gène *Rinf* dans le tissu hématopoïétique.

En 2015, une équipe Corréenne a décrit des travaux effectués à partir de souris invalidées constitutivement pour *Rinf* sur un fond génétique C57bl6 similaire. Ces souris ont été décrites comme viables et fertiles (H-Y Kim et al. 2015). De ces travaux, les auteurs ont également montré que les croisements hétérozygotes de ces souris respectaient un ratio mendélien (dont la progénie se compose d'au moins 50% de souris hétérozygote pour 25% de souris *Rinf*^{+/+} et *Rinf*^{-/-}). Ils ont mis en évidence, par un mécanisme dépendant de la voie Wnt/ β -caténine que ces souris avaient une ossification plus dense dû à une division accrue des ostéoclastes, sans pour autant changer le poids de ces souris. D'autres articles de leur équipe ont également montré que ces souris avaient un processus de cicatrisation accélérée par prolifération des myofibroblastes et la production de collagène (S.-H. Lee et al. 2015).

Ces résultats suggéraient une étude normalement aisée de l'hématopoïèse et de l'érythropoïèse murine. Dès les premières études nous avons été confrontés à un phénotype bien différent de celui décrit dans la littérature, si bien qu'il a été dans un premier temps nécessaire d'analyser le phénotype de viabilité et de fertilité de ces souris dans le but de mieux caractériser ce modèle d'étude.

Ainsi, dans cette seconde partie je me suis ainsi intéresser à exposer ces études de viabilité puis de fertilité des souris invalidées de façon constitutive pour *Rinf* avant d'analyser leur hématopoïèse. J'ai choisi de garder un fil conducteur avec le mécanisme d'action que j'ai mis en évidence (pour lequel RINF induit *SMAD7*) dans l'optique d'étayer ensuite une discussion permettant de mettre en lien ces deux parties.

1. Les souris *Rinf^{f/-}* sont partiellement viables

Afin de mettre en évidence un éventuel phénotype de létalité embryonnaire (ou périnatale), nous avons recensé la taille des portées observées à la naissance (**A**). La **figure S4** représente le nombre moyen de souris obtenues par portée entre des croisements WT x WT et Het x Het. Les souris *Rinf^{f/-}* ont des portées environ 30% plus petites, passant de 7 à 4,5 souriceaux par portée.

Dans un second temps, nous avons comparé la répartition des génotypes des souriceaux obtenus après chaque croisement de souris hétérozygotes (croisement Het x Het). Au sein de ces croisements, on observe une diminution du nombre de souris *Rinf^{f/-}* (7%, n=6) homozygotes et *Rinf^{f/+}* hétérozygotes (54%, n=44), comparativement à ce qui était statistiquement attendu. Les souris *Rinf^{f/+}* et *Rinf^{f/-}* présentent ainsi, un défaut de viabilité notable et on estime qu'un peu plus d'une souris sur quatre survit jusqu'au sevrage. Toutefois, l'inactivation totale de *Rinf* peut être compatible avec la vie, et le quart des souris suivantes à l'âge adulte nous a permis d'étudier son phénotype.

Nous nous sommes ensuite intéressés à déterminer si le défaut de viabilité était dû à une mort embryonnaire ou périnatale des souris *Rinf^{f/+}* et *Rinf^{f/-}*. Dans le cadre d'une collaboration avec la plateforme d'imagerie du petit animal (PIPA) de notre institut, des accouplements contrôlés ont été réalisés afin d'estimer le nombre de résorptions embryonnaires par portée (**C**, **D**). Dans la littérature il est établi qu'en moyenne, pour des accouplements de souris C57BL6, il y a entre 5 et 10% de résorptions embryonnaires, visibles par échographie (**Figure 11 D**) et à un stade de la gestation compris entre 8 et 12 jours après fécondation. Dans notre cas, on observe 25% de résorptions embryonnaires pour des accouplements de souris *Rinf^{f/+}*, contre 12.5% observé par des accouplements WT. Cette tendance pour l'instant non significative statistiquement, a été confirmée par d'autres expériences d'accouplements contrôlés (Het x Het) et pour lesquelles les souris hétérozygotes gestantes ont été sacrifiées à un stade de gestation plus tardif (E16) (données non montrées). **Ainsi, il y a une mort *in utero* des souris mutantes. Nous avons également observé une mort périnatale de souris *Rinf^{f/+}* et *Rinf^{f/-}*, avant la période de sevrage.** Au-delà de cette période, les souris *Rinf^{f/+}* et *Rinf^{f/-}* semblent avoir une longévité identique aux souris WT même si certaines souris *Rinf^{f/-}* sont plus chétives.

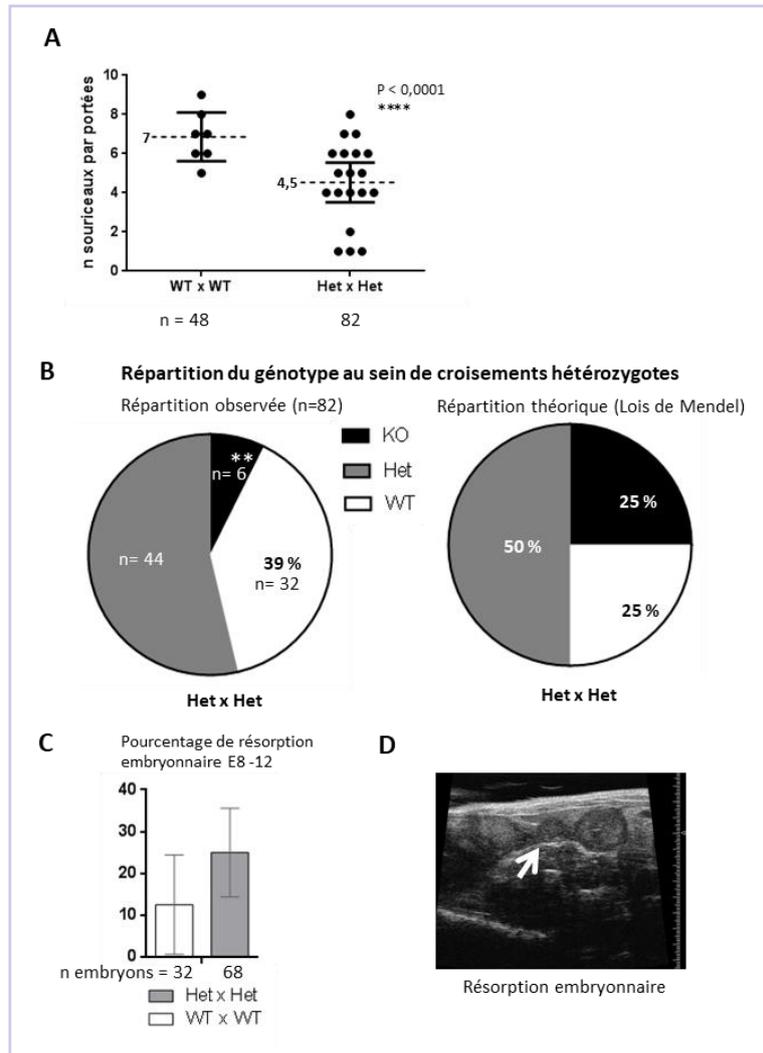


Figure S4: Mise en évidence du défaut de viabilité des souris homozygotes *Rinf*^{-/-} et hétérozygotes *Rinf*^{+/-}. **(A)** Sont représentés en le nombre moyen de souris par portée. Pour les croisements, le premier génotype est celui du mâle et le second celui de la femelle, ainsi WT x WT signifie Mâle WT x Femelle WT (test de student, $p < 0.0001$, les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95%). On distingue une diminution du nombre de souriceaux obtenus à la naissance par portées Het x Het, par rapport aux portées de souris WT. **(B)** Les génotypes observés des descendance de croisements hétérozygotes comptent également moins de souris hétérozygotes et homozygotes que normalement attendu (25%, 50% et 25% pour un croisement hétérozygote suivant la loi de Mendel). **(C)** Les échographies effectuées à la plateforme d'imagerie du petit animal de notre institut à partir d'accouplements contrôlés révèlent une augmentation du nombre de résorptions embryonnaires ; 25% lors des croisements hétérozygotes contre 12,5% en croisement WT. **(D)** Une résorption embryonnaire observée par échographie.

2. Les souris *Rinf*^{-/-} sont peu fertiles

Des nombreuses tentatives de croisements infructueux ont mis en évidence des problèmes de reproduction des souris homozygotes *Rinf*^{-/-}, aussi bien pour les mâles que pour les femelles.

Les échographies réalisées (à la plateforme d'imagerie du petit animal) sur les souris femelles *Rinf*^{-/-} (pour le suivi des résorptions embryonnaires), ont révélé une dysplasie de leurs cornes utérines, comme illustré **figure S5 A et B**. L'analyse histologique (**Figure 12 C**) suggère une disparition et/ou une élongation de l'endomètre qui pourrait être responsable de cette dilatation importante des cornes utérines. En revanche, nous n'avons pas observé de défaut notable au niveau de l'ovaire (taille/structure, diversification des follicules atériques/à larges antrum/primaires/secondaires).

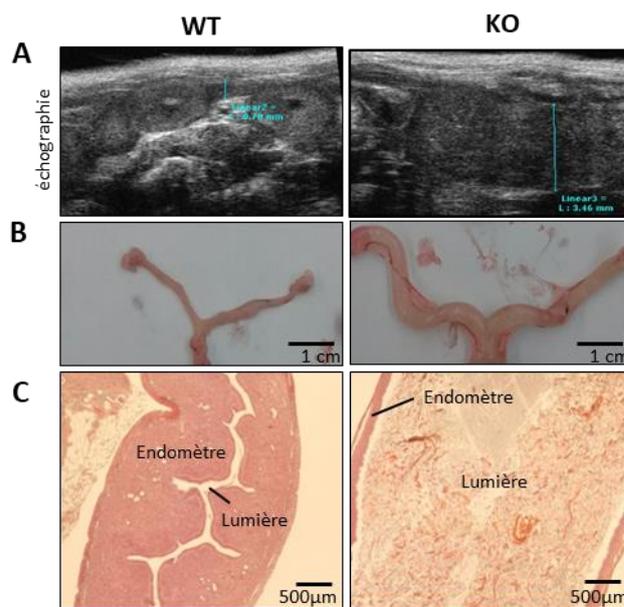


Figure S5: Mise en évidence du défaut de fertilité des souris femelles *Rinf*^{-/-}, homozygotes. **A (gauche)**, image d'échographie de cornes utérines de souris WT gestantes (L = 0.70mm). **A (droite)**, image d'échographie de corne utérine de souris mutantes (L= 3.50mm). **B (gauche)**, corne utérine de souris WT, après dissection. **B (droite)**, cornes utérines de souris KO, après dissection. **C (gauche)**, coupe histologique de corne utérine de souris WT femelle. **C (droite)**, coupe histologique de corne utérine de souris *Rinf*^{-/-}. Coloration de type H et E (hématoxyline, éosine). Chez les souris KO, on observe une dilatation des cornes utérines, en largeur et en longueur, probablement liée au défaut de fertilité soupçonné.

Afin de mieux comprendre les problèmes de fertilité, même partielle, des mâles KO homozygotes, nous avons effectué des coupes histologiques de leurs *testis* (**Figure S6 A**). Un défaut au niveau des tubes séminifères, foyer de la gamétogénèse a été observé. On observe une désorganisation structurale des tubes séminifères, enchevêtrés de manière anarchique, ainsi qu'une spermatogénèse incomplète, représentée ici par un élargissement de la lumière du tube séminifère et un arrêt de différenciation des spermatogonies.

Ces données histologiques expliquent du moins en partie, les problèmes de fertilité observés aussi bien pour les mâles que les femelles KO.

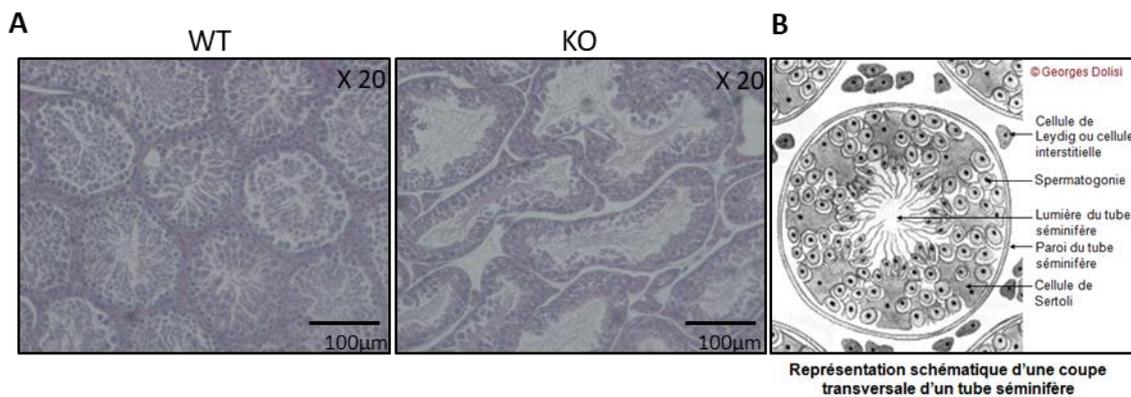


Figure S6: Mise en évidence du défaut de fertilité partiel des souris mâles *Rinf*^{-/-}, homozygotes. **A (gauche)**, coupe histologique transversale de tubes séminifères de testis de souris WT **A (droite)**, coupe transversale de tubes séminifères de testis de souris mutante. Coloration de type H et E (hématoxyline, éosine). **B** schéma annoté d'une coupe de tube séminifère de testis. On observe que la lumière des tubes séminifère est beaucoup plus grande au niveau des *testis* de souris *Rinf*^{-/-}, les tubes séminifères sont désorganisés, la spermatogénèse semble incomplète.

3. *Rinf* ne semble pas être exprimé dans l'érythropoïèse murine

Nous avons cherché à voir si l'expression de *Rinf* au cours de l'érythropoïèse était similaire entre l'homme et la souris. De récents travaux de Socolovsky et Tusi (Tusi et al. 2018), ainsi que des données de RNA-seq effectuées par An (X. An et al. 2014) (données non montrées) suggèrent des différences d'expression de *Rinf* dans l'érythropoïèse des deux espèces. Ces résultats (**Figure S7**) suggèrent que *Rinf* ne serait pas exprimé dans l'érythropoïèse mais qu'il serait particulièrement exprimé dans le compartiment souche, LSK, ainsi que dans les progéniteurs à potentiel lymphoïdes (CLP). Des premières observations effectuées sur notre modèle murin, nous n'avons pas détecté d'érythropoïèse de stress (observable par une splénomégalie ou à une augmentation de progéniteurs érythroïdes dans la MO et la rate) des souris femelles de 8 à 10 semaines. En revanche, nous avons observé quelques splénomégalies et une cellularité plus importante lors du vieillissement de ces souris *Rinf* homozygotes. Il faudrait recueillir davantage de données et mettre en place un suivi *via* la mise en place de cohortes de vieillissement afin de surveiller différents paramètres (variation de l'hématocrite, et échographie pour détecter les splénomégalies).

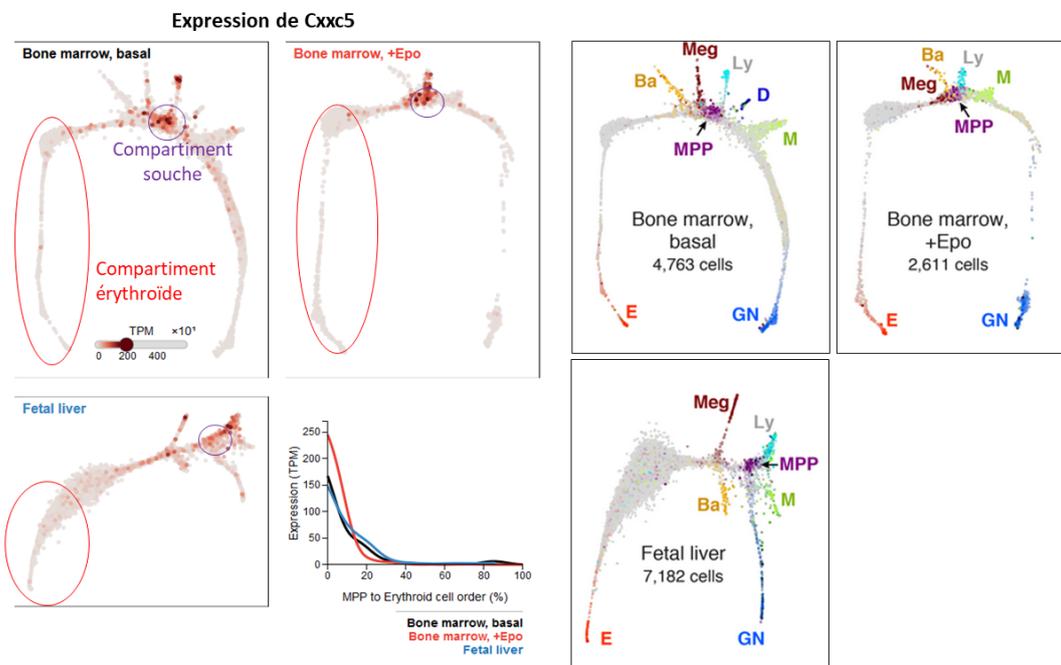


Figure S7: Expression de *Rinf/Cxhc5* lors de la myélopoïèse de souris adultes et lors du développement embryonnaire (dans le foie foetal). E = Cellules Erythroïdes, Ba = Basophile/Mastocyte, Meg = Mégakaryocyte, Ly = Cellules Lymphoïdes, D = Cellules dendritiques, M = Monocytes, GN = Granulocytes neutrophiles, MPP = Progéniteurs Multipotents. *D'après* (Tusi et al. 2018). *Lien accessible* : https://kleintools.hms.harvard.edu/paper_websites/tusi_et_al/index.html

4. *Rinf* est exprimé dans les progéniteurs les plus immatures et son expression corrèle avec *Smad7* dans les souris WT.

Dans l'hématopoïèse humaine *RINF* étant exprimé au sein des progéniteurs les plus immatures, nous avons voulu voir ce qu'il en était dans l'hématopoïèse murine, tout comme l'expression de *SMAD7*. Pour ce faire, nous avons procédé à des tris par cytométrie en flux des différents progéniteurs hématopoïétiques (CSH, ST-CSH, MPP, EMP, CMP et GMP) et analysé l'expression ARN de *Rinf* et de *Smad7* par RT-PCR en temps réel. Nous observons que les profils d'expression de *Rinf* et de *Smad7* se ressemblent, hormis éventuellement au niveau du CMP. *Rinf* et *Smad7* sont tous les deux exprimés chez la CSH (**Figure S8**).

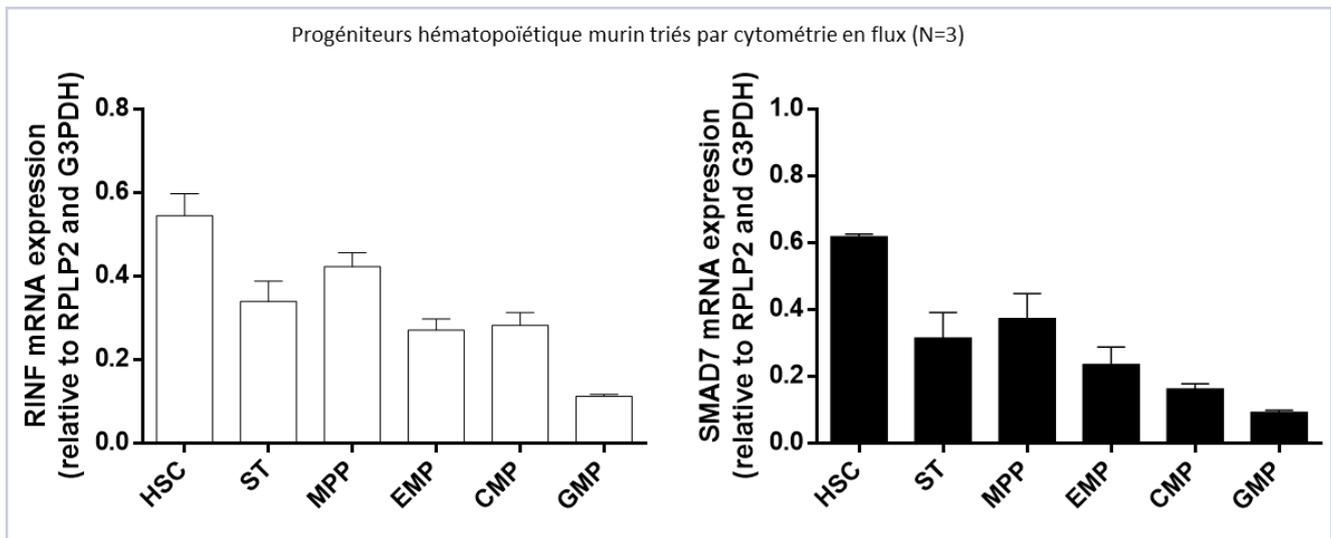


Figure S8: Analyse de l'expression de l'ARNm de *Rinf* et de *Smad7* dans les progéniteurs hématopoïétiques murin triés par cytométrie en flux. Après un tri basé sur l'expression des marqueurs membranaires CD34, FC γ R, c-kit, Sca-1, CD150 et exclusion des populations *lin*⁺, les niveaux d'expression de *Rinf* et de *Smad7* ont été établis par RT-PCR en temps réel pour trois souris. (Ratio sur les gènes de référence *Rplp2* et *G3pdh*). En parallèle, son niveau d'expression a aussi été évalué à partir de données de puces-à-ADN/RNA-seq accessibles en ligne (*bloodspot.eu*).

5. L'expression de *Smad7* est diminuée dans la moelle osseuse totale des souris *Rinf*^{+/-} et *Rinf*^{-/-}

Puisque, l'expression de *Rinf* et de *Smad7* suivent le même profil au sein des progéniteurs hématopoïétiques les plus immatures, nous avons voulu comparer l'expression de *Smad7* des MO de souris *Rinf*^{+/+}, *Rinf*^{+/-} et *Rinf*^{-/-}. Après lyse des globules rouges, nous avons effectué des RT-PCR en temps réel pour mesurer l'expression de *Rinf* et de *Smad7*. Dans la moelle totale de souris, nous observons que *Smad7* est diminué, aussi bien dans les souris homzygotes *Rinf*^{-/-} (40% de diminution) que dans les souris *Rinf* hétérozygotes (**Figure S9**).

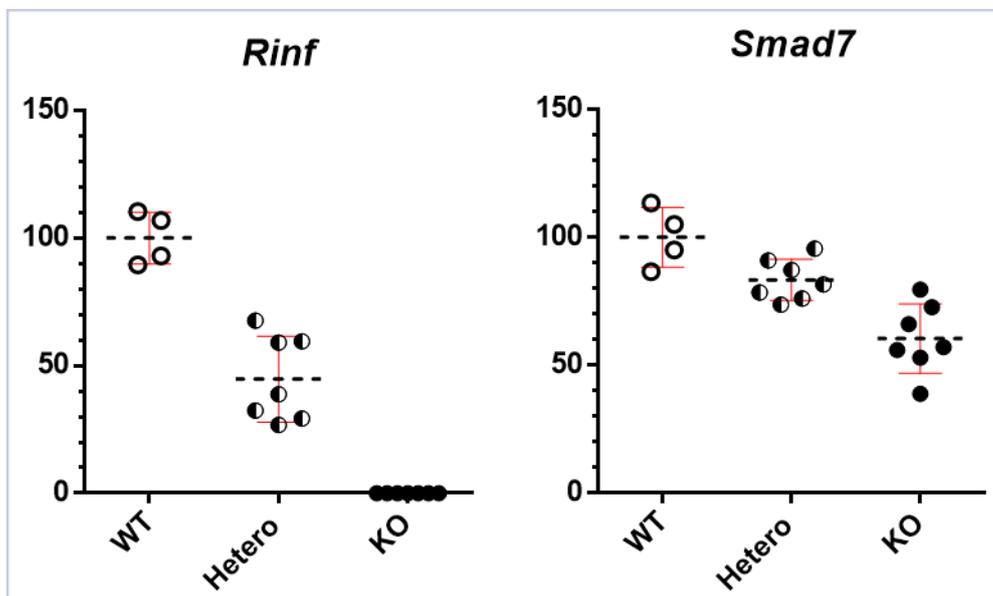


Figure S9: Analyses de l'expression ARN de *Rinf* et de *Smad7* dans la MO de souris WT, *Rinf*^{+/-} et *Rinf*^{-/-}. Les niveaux d'expression ARN de *Rinf* et de *Smad7* ont été établis par RT-PCR en temps réel à partir de MO de souris d'âges variés (9 à 17 semaines): n=4 WT, n=7 Het, n= 7 KO. Chaque point correspond à une souris. Les expressions relatives de *Rinf* et de *Smad7* ont été normalisées à partir de la *G3pdh* et de *Hprt*. L'expression ARN de *Rinf* et de *Smad7* est exprimée en pourcentage d'expression ARN respective de la MO WT. La barre d'erreur correspond à la déviation standard (s.d.)

6. Analyse des progéniteurs hématopoïétiques des souris *Rinf^{-/-}*

Par la suite nous avons analysé par cytométrie en flux la répartition des progéniteurs hématopoïétiques (*via* l'utilisation de marqueurs de surfaces Sca, Kit, CD34, FcγR et Lin-) (**A**). Ces résultats étant hétérogènes entre les sexes et l'âge des souris, nous avons étudié en priorité les femelles *Rinf^{-/-}* jeunes adultes (8 à 10 semaines). Nous avons également comparé la cellularité des différents organes hématopoïétiques (MO et rate). La **figure S10 (B et C)** montre la répartition des GMP, CMP, EMP et des LSK dans la MO de ces souris (femelles 8-10 semaines), en pourcentage de la fenêtre de morphologie Sca-, c-kit+ (lin-) (**B**) et rapporté à la cellularité des MO (**C**). On n'observe pas de changement significatif de répartition des progéniteurs hématopoïétiques GMP, CMP, EMP mais une augmentation des LSK chez les souris *Rinf^{-/-}*.

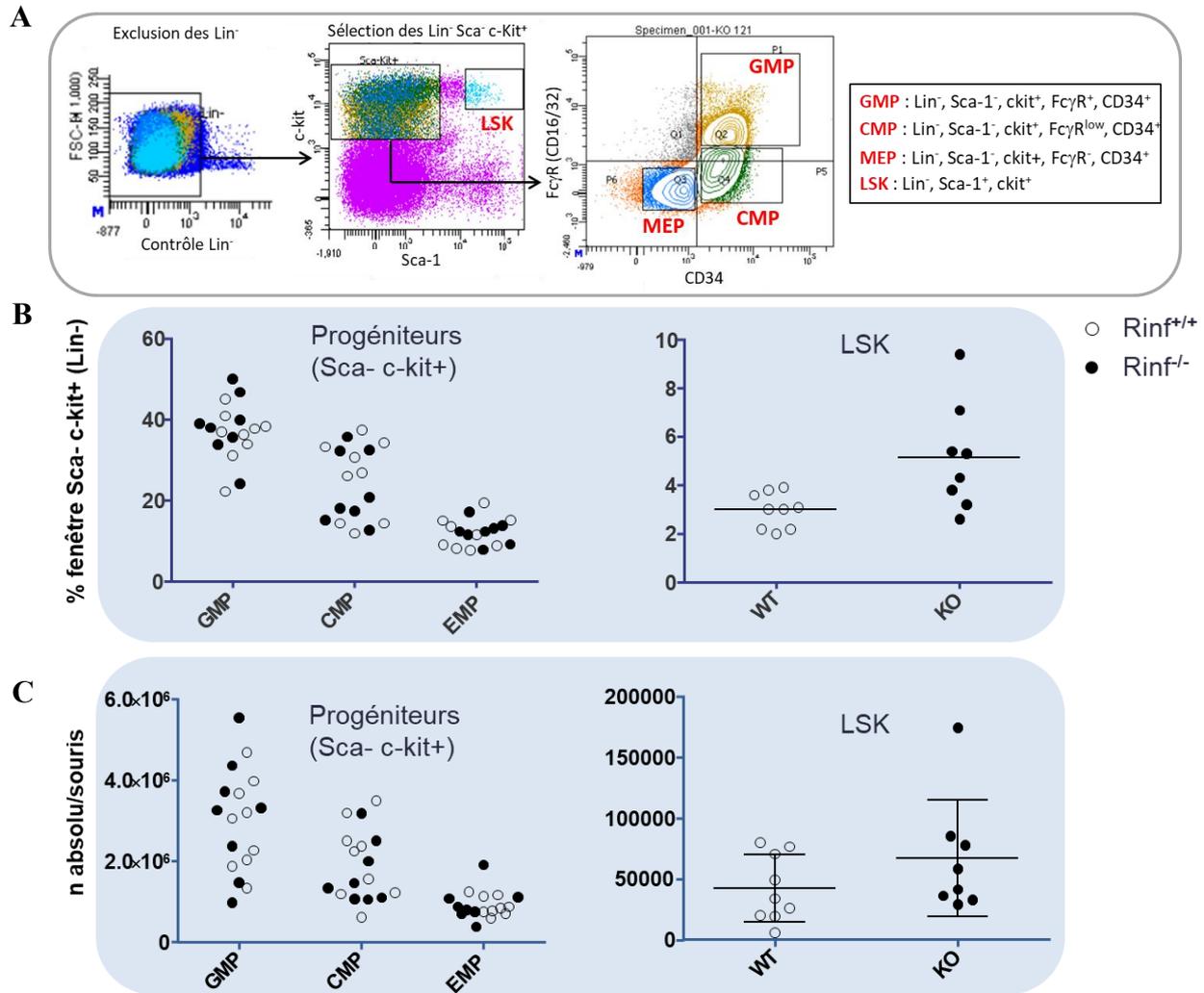


Figure S10: Analyse de la répartition des progéniteurs hématopoïétiques de la MO des souris *Rinf^{+/+}* et *Rinf^{-/-}*. Après une analyse basée sur l'expression des marqueurs membranaires CD34, FcγR, c-kit, Sca-1, CD150 et exclusion des populations *lin⁺* (A), il n'a pas été noté de différence notable dans la répartition des progéniteurs GMP CMP EMP entre les souris *Rinf^{+/+}* et *Rinf^{-/-}*. On observe une augmentation significative de LSK chez la souris *Rinf^{-/-}* (B) qui, une fois rapporté à la cellularité totale de la MO ne devient qu'une tendance qui reste à confirmer (C).

Conclusion

La perte de *Rinf* (par invalidation constitutive) est compatible avec la vie dans le modèle murin. Il est tout de même observé une **perte de viabilité importante *in utero* et périnatale** chez les souris *rinf*^{+/-} et *Rinf*^{-/-}. Ces souris *Rinf*^{-/-} présentent un **défaut de fertilité** et des défauts de développement de certains organes qui méritent une observation plus approfondie. Malgré une absence d'expression de *Rinf* au cours de l'érythropoïèse murine, son invalidation dans le modèle murin aurait un impact dans l'hématopoïèse murine en particulier au niveau de la LSK (cellule souche hématopoïétique). De plus, **l'absence de *Rinf* semble affecter l'expression de *Smad7* dans la MO des souris *Rinf*^{-/-} et des souris *Rinf*^{+/-} ainsi que dans d'autres organes**, laissant supposer que notre mécanisme mis à jour pourrait avoir également lieu dans des tissus non hématopoïétiques.

Discussion et perspectives

Partie 1 Erythropoïèse humaine

1. Impact de RINF dans l'érythropoïèse normale

RINF interfère avec l'érythropoïèse

Nous avons ainsi montré que RINF était exprimé dans l'érythropoïèse humaine, son expression diminuant au cours de la différenciation érythroïde. Les expériences de perte de fonction médiées par stratégie lentivirale (shARN RINF) ont montré que la perte précoce de RINF accélérât la maturation érythroïde, aboutissant **à une diminution d'érythrocytes générés** et également à un nombre de BFU-E plus élevé mais de tailles plus petites.

Si les effets dus à la perte d'expression de RINF sur l'accélération de la maturation érythroïde étaient facilement observés dès nos premières cinétiques érythroïdes, les résultats concernant la perte d'expansion (c.a.d la diminution du nombre total de globules rouges générés en milieu liquide), n'ont pu être mis en évidence que récemment, par l'affinement de nos méthodes de détection. En effet, les courbes de croissance des populations shARN-RINF et shARN-Contrôles sont globalement superposables sur les trois premières semaines de culture (jusqu'à J15 d'EPO), signe qu'il n'y a probablement pas d'accélération notable du cycle cellulaire. Ce n'est que sur les derniers jours des cinétiques (vers 15-20j d'EPO), que la perte d'expression de RINF (effective dès j0 EPO) altère les capacités d'expansion de la population cellulaire. La différence d'expansion n'excédant généralement pas 2 doublements cellulaires en fin de différenciation. De plus, nous savons maintenant que cette différence ne peut être observée qu'en présence de TGF- β . Cette cytokine, dépend d'une production autocrine/paracrine de TGF- β , celle-ci pouvant dépendre de la concentration cellulaire et de la fréquence des passages (des paramètres expérimentaux assez difficiles à standardiser d'une cinétique à l'autre).

Quant aux expériences de gain de fonction (par surexpression de RINF), des expériences antérieures avaient montré une baisse de prolifération et de clonogénicité des CD34⁺ CD38⁻ (sans mortalité apparente) après ajout du vecteur de surexpression RINF, rendant ainsi plus difficile l'étude du gain de fonction de RINF dans les cellules primaires (données non montrées). Ces données avaient été obtenues avec un vecteur rétroviral (Mig-RINF) qui pouvait conduire à une trop forte expression dans les cellules primaires, et donc une signalisation non physiologique. Il serait intéressant de refaire cette expérience, cette fois-ci par des transductions du vecteur de surexpression RINF après un tri basé sur l'expression du CD36 afin d'observer l'effet de l'expression de RINF dans les stades de maturation érythroïde terminale (sans interférer avec l'effet de la modulation de RINF dans la CSH/HSPC). Il serait important de disposer d'un vecteur lentiviral inducible qui nous permettrait de contrôler le niveau d'expression ectopique de *RINF*. De cette expérience, on pourra éventuellement mettre en évidence un ralentissement de la différenciation érythroïde ainsi qu'une augmentation de la prolifération cellulaire.

Des travaux précédents ont montré dans deux lignées érythroleucémiques, K562 et UT7, que la surexpression de RINF retardait d'hémoglobinisation de ces lignées en présence d'hémine et d'EPO respectivement. A l'inverse, sa perte de fonction entraîne une hémoglobinisation plus rapide de celles-ci. Bien que ces deux lignées ne différencient pas en présence d'hémine et d'EPO, elles mûrissent *via* notamment la synthèse d'hémoglobine (visualisable par test benzidine). On observe également une diminution d'expression de la protéine RINF au cours de cette maturation dans ces deux lignées comme observée lors de la différenciation érythroïde des cellules primaires. Malgré le fait qu'il s'agisse de lignées, par définition "aberrantes", puisque de nombreuses voies de signalisation sont altérées, il est confortant d'observer un comportement similaire de RINF entre les lignées hématopoïétiques et les cellules primaires en différenciation.

L'ensemble de ces résultats montrent que CXXC5/RINF interfère avec l'érythropoïèse. Ainsi, RINF régulerait la différenciation de façon négative, sa perte de fonction a un rôle pro-différenciant, accélérant la cinétique de maturation érythroïde.

RINF/CXXC5 a été découvert dans la granulopoïèse et son expression est nécessaire à la différenciation des lignées HL60 et NB4 induite par les rétinoïdes. Historiquement les cellules de LAP (Leucémie Aiguë Promyélocytaire) se distinguent des autres LAM par leur

capacité à répondre efficacement aux rétinoïdes permettant la différenciation terminale des blastes leucémiques bloquées en différenciation. L'action des rétinoïdes a déjà été étudiée par le passé dans d'autres voies de l'hématopoïèse, notamment dans l'érythropoïèse et la myélopoïèse mais ces expériences étaient basées sur des méthodes de cultures différentes que les techniques d'études modernes des cellules primaires et qui mériteraient d'être réalisées dans les conditions actuelles, notamment l'IL4 et l'IL9 ou des sérums de composition variables (en cytokines, facteurs de croissance, hormones...) qui ne sont plus utilisés aujourd'hui (Douer et Koeffler 1982) (Rusten et al. 1996). Les rétinoïdes étant considérées comme un agent pro-différenciant dans la granulopoïèse (augmentant l'expression de *RINF*), nous avons également testé l'action de l'ATRA en culture primaire sur l'érythropoïèse et avec nos conditions de cultures modernes (IL-3, IL-6, SCF, BIT 15% en milieu IMDM). Après ajout d'EPO (J7 amplification des progéniteurs), l'ATRA semble ralentir la différenciation érythroïde (retard d'acquisition des marqueurs de surfaces de maturation érythroïde CD71 et GPA) sans toutefois bloquer la différenciation. Après 5 jours de traitement, les cellules semblent ne pas supporter l'ATRA (observé par un changement de la taille et morphologie en cytométrie en flux), probablement dû aux autres effets de cette drogue. Il serait intéressant de voir si l'ajout d'ATRA en culture liquide d'érythroblastes primaires augmente (à 4 et 8h d'exposition) le niveau d'expression (ARN ou protéine) de *RINF*.

Mise en évidence de SMAD7 de la signalisation du TGF- β dans l'érythropoïèse

Du point de vue du mécanisme moléculaire mis en jeu, nous avons identifié grâce à une approche microarray de trois lignées érythroleucémiques K562, UT7 et MV4-11 en condition de sh*RINF* (perte d'expression de *RINF*), *SMAD7*, un inhibiteur de la signalisation du TGF- β . Il aurait été plus probant de réaliser ce microarray en condition d'induction de l'hémoglobinisat ion (par l'hémine) de ces lignées (ou même dans des cellules primaires au cours de la différenciation érythroïde) mais notre approche s'est révélée être suffisante pour identifier, un effecteur important de *RINF*, et à moindre coût.

Nous avons par la suite pu valider la pertinence de notre gène candidat notamment par des expériences de surexpression de *RINF* dans la lignée K562 montrant une augmentation de *SMAD7*. Nos expériences de perte d'expression de *RINF* réalisées cette fois-ci dans les cellules primaires CD34⁺ ont également montré que la perte de *RINF* entraînait une perte de *SMAD7*.

Après avoir observé que *RINF* activait *SMAD7*, plusieurs hypothèses étaient possibles, ce mécanisme pouvait être direct (transcriptionnellement ou *via* une interaction protéine-protéine) ou alors indirect (*via* l'activation de cibles intermédiaires). Bien que le mécanisme d'action le plus souvent décrit dans la littérature (en tant qu'inhibiteur de la voie Wnt/ β -caténine) soit une interaction protéique avec *DVL*, nous avons décidé de poursuivre notre fil conducteur et d'effectuer des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps anti-*RINF* afin de mettre en évidence un éventuel mécanisme d'activation transcriptionnel de *RINF* au niveau du promoteur de *SMAD7*. Cette dernière expérience étant justifiée par le fait que *RINF* avait une localisation majoritairement nucléaire dans les cellules hématopoïétiques (cellules de lignées et cellules primaires). De ces expériences, aussi réalisées en condition de surexpression de *RINF*, nous avons mis en évidence dans la lignée K562 l'action de *RINF*, en tant qu'activateur transcriptionnel de *SMAD7* (aussi suggéré par l'augmentation des marques d'histones H3K4me3 dans les expériences de ChIP). Ce mécanisme d'action moléculaire mis en évidence a été renforcé par des expériences de surexpression de *SMAD7* dans la lignée K562, montrant par ajout d'hémine que la synthèse d'hémoglobine normalement induite par le sh*RINF* est bloquée par la surexpression de *SMAD7* (*SMAD7* est donc en aval de *RINF* et *SMAD7* ralentit l'acquisition de la synthèse d'hémoglobine).

SMAD7 faisant partie des I-*SMAD*, inhibiteurs de la famille du TGF- β , nous devons par la suite avoir une notion des effecteurs de la famille du TGF- β prenant part lors du processus d'érythropoïèse (ici étudié en culture liquide à partir de CD34⁺ de sang de cordon ou de MO adulte). L'approche protéomique de Gautier et al, 2016 qui a étudié l'érythropoïèse dans des conditions similaires à la nôtre (à part l'utilisation de dexaméthasone) a permis d'avoir une idée des effecteurs de la famille du TGF- β présents au cours d'érythropoïèse. Ainsi, l'absence de détection d'effecteurs de la famille de Nodal, des BMP et la présence de TGF- β 1 en début de différenciation nous a suggéré l'implication du TGF- β 1. Des expériences de perte d'expression de *RINF* dans les érythroblastes primaires en présence d'un inhibiteur du TGF- β RI (SB431542) ont suggéré une restauration de la différenciation érythroïde normalement accélérée en présence du sh*RINF*. Nous avons également testé cette expérience en présence d'un anticorps anti-TGF- β 1 d'autant plus spécifique que le SB431542, inhibiteur des récepteurs au TGF- β RI qui s'avère également interagir avec des récepteurs aux activines (ALK4 et 7: ACVR1B et ACVR1C respectivement). Cette dernière expérience est très couteuse en anticorps déplétant (une

différenciation érythroïde se faisant sur une vingtaine de jours) et nécessiterait d'être refaite une fois de plus.

De ces résultats, nous avons ainsi mis en évidence un mécanisme d'action original dans lequel RINF/CXXC5 serait un activateur transcriptionnel direct de *SMAD7*, permettant de moduler la différenciation érythroïde en interférant avec une signalisation TGF- β autocrine.

C'est à la suite de la mise en évidence de ce mécanisme d'action que nous avons repris les analyses sur la prolifération et entrepris de mieux caractériser la taille globale des colonies BFU-E.

En effet, dans la littérature il a déjà été suggéré une signalisation du TGF- β autocrine au cours de la différenciation érythroïde notamment par les travaux de Akel et ceux Böhmer (Akel et al., 2003) (Bohmer 2004). Il serait intéressant d'étudier l'importance de cette autocrinie dans un contexte plus physiologique, *in vivo*. Chez l'homme, l'érythropoïèse se déroule dans la niche hématopoïétique de la MO, où les érythroblastes sont concentrés au sein d'îlots érythroblastiques et contrôlés par les macrophages. On sait actuellement peu de chose sur la concentration du TGF- β 1 présente dans la niche hématopoïétique (plus précisément au sein des îlots érythroblastiques). En culture liquide (*in vitro*), les érythroblastes sont maintenus à une faible concentration pour éviter une induction d'apoptose et une altération du milieu de culture (néfaste pour les érythroblastes). *In vivo*, cette apoptose serait prise en charge par les macrophages, permettant une concentration plus forte d'érythroblastes ainsi qu'une potentialisation éventuelle de l'autocrinie du TGF- β 1, sans altérer l'environnement.

Il est aussi à noter que les macrophages CD169⁺ peuvent produire du TGF- β 1 dans des conditions de stress notamment, l'étude de l'érythropoïèse par la mise en culture liquide d'îlots érythroblastiques pourrait permettre une étude plus physiologique de l'érythropoïèse. Ces expériences permettraient d'étudier éventuellement plus en détail les mécanismes d'énucléation.

La production des globules rouges *in vitro* à partir de cellules souches hématopoïétiques est un domaine d'activité en expansion (Rousseau, Giarratana, et Douay 2014). Il pourrait un jour remplacer le don du sang, ne parvenant pas à contenter la demande actuelle. Cette demande

ne cesse de croître d'année en année du fait d'une population mondiale grandissante avec une espérance de vie en constante augmentation. Les résultats de nos recherches nous encouragent à suggérer la modulation du TGF- β 1 lors de la culture *in vitro* des CSH. Ceci en ajoutant des inhibiteurs du TGF- β R lors de la phase de culture de l'érythropoïèse précoce (dans le but de favoriser l'amplification des BFU-E *early*) puis en ajoutant du TGF- β 1 lors de la phase de différenciation tardive (stade CFU-E/Pro-E) ou en ajoutant par exemple un inhibiteur de SMAD7 déjà utilisé en clinique (Monteleone et al. 2015).

2. Contribution éventuelle de RINF dans les hémopathies

Au cours des dernières années, des dérégulations du gène RINF ont été mises en évidence dans des cancers hématopoïétiques tels que la SMD ou les LAM.

Le mécanisme d'action mis en évidence de RINF à travers SMAD7 ouvre un nouveau prisme de lecture quant à sa contribution éventuelle à certaines pathologies où la signalisation TGF- β est dérégulée. Le meilleur exemple est celui de la SMD 5q- dans laquelle RINF/CXXC5 avaient été suggéré comme impliqué dans la pathologie principalement médiée par une perte d'expression de *RINF* (Treppendahl et al. 2013), (Gelsi-Boyer et al. 2009), (Rinke et al. 2017). Ajouté à cela les travaux de Zhou et de Bhagat (L. Zhou et al. 2011), (Bhagat et al. 2013) ont montré que la réduction de *SMAD7* contribuait à la surexpression de la voie du TGF- β dans les CD34⁺ de SMD à délétion 5q. Leurs travaux ont également montré une diminution de *SMAD7* au sein des CD34⁺ de SMD, et que l'ajout d'un inhibiteur du récepteur TGF- β R1 (Galunisertib, également appelé LY2157299) augmentait le nombre de BFU-E générées par des CD34⁺ de patients atteints de SMD 5q- (suggérant une amélioration éventuelle de l'anémie s'il était administré chez le patient). Bien qu'ils proposent en 2013 que la modulation de *SMAD7* soit dû à un miR (miR-21), il est légitime de se demander si la perte de RINF ne contribuerait pas à la perte de l'expression de *SMAD7* et à la sensibilisation des CD34⁺ de MO de patients SMD 5q- à la signalisation TGF- β exacerbée, contribuant ainsi à l'érythropénie. Pour répondre du moins en partie à cette question, il serait intéressant de surexprimer RINF dans des CD34⁺ de MO de patients SMD 5q- et d'observer si le rétablissement de *RINF* augmente le nombre de BFU-E en méthyl et/ou la capacité d'expansion érythroïde. Il serait également intéressant d'observer si le mécanisme d'action proposé de l'action par mir-21 est en lien ou non avec celui de RINF sur *SMAD7*.

Dans cette pathologie, il est suggéré que l'ajout d'inhibiteur du TGF- β , notamment des inhibiteurs des récepteurs et *ligand-trap* évoqué précédemment (ACE-536, appelé luspatercept, sotatercept) améliore l'anémie des patients. Actuellement, cet inhibiteur est en phase d'essais cliniques de phase 1 (Sherman et al. 2013) et de phase 2 (Platzbecker et al. 2017). Plus généralement, le mécanisme d'action moléculaire mis en évidence dans le cadre de mes travaux suggère que la perte d'expression de *RINF* pourrait être fonctionnellement impliquée dans d'autres hémopathies.

Partie 2 Invalidation de *Rinf* chez la souris

1. impact de la perte de *Rinf* dans le modèle murin *Rinf*^{-/-}

*Les souris *Rinf*^{-/-} sont peu viables*

Les premières observations effectuées sur les souris *Rinf*^{-/-} ont été essentiellement le fruit d'une étude rétrospective sur des recensements d'accouplement et de génotypages réalisés pendant plusieurs mois. Ces travaux ont ainsi montré que les portées issues des souris de croisement hétérozygotes sont plus petites, dû à une perte de souris hétérozygotes et homozygotes. La perte de ces souris peut s'expliquer par une léthalité embryonnaire ou périnatale. Par la suite, les expériences d'échographies à E12,5 ont permis de mettre également en évidence une augmentation des résorptions embryonnaires chez les accouplements de souris *Rinf*^{+/-}. Il s'est également avéré que certaines souris *Rinf*^{+/-} et *Rinf*^{-/-} mouraient avant leur sevrage (mort des souriceaux avant les 20 jours suivant la naissance). L'ensemble de ces résultats suggère que la perte de RINF entraîne une léthalité chez certaines souris *Rinf*^{+/-} et *Rinf*^{-/-} que ce soit *in utero* ou en périnatale.

Au cours de ma thèse, nous disposions également d'une souris invalidée pour *Rinf* de manière tissu spécifique (*via* un promoteur Vav-Cre), dans le tissu hématopoïétique. Le fait que nous avons des difficultés à obtenir des souris homozygotes (malgré le nombre d'hétérozygotes) nous porte à penser que le défaut de viabilité des souris constitutivement inactives *Rinf*^{-/-} serait du la conséquence d'un défaut d'hématopoïèse.

La mort des souris *Rinf*^{+/-}, *Rinf*^{-/-} que ce soit *in utero* ou à la naissance, fait penser à un phénotype de *growth defect*, comme retrouvé chez les souris invalidées pour les TET (TET1, (Yamaguchi et al. 2013) TET1/TET2 double KO (Dawlaty et al. 2013), TET1/TET2/TET3 triple KO (Dawlaty et al. 2014)). En effet, une taille en moyenne plus petite des souris homozygotes ainsi qu'une réduction de fertilité est observée chez ces souris. RINF/CXXC5 étant suggéré dans la littérature tantôt comme un inhibiteur TET2 (Ko et al. 2013), tantôt comme une plateforme d'ancrage nécessaire à TET2, une enzyme dépourvue de domaine de liaison à l'ADN de type CXXC (Shixin Ma et al. 2017). Il serait intéressant de connaître chez nos souris le profil d'hydroxyméthylation ou de méthylation présent dans différents organes des souris *Rinf* homozygotes.

Nous n'avons pas observé de malformation majeure d'organe (non sexuel) lors d'autopsies effectuées chez des souris jeunes adultes (d'âge inférieur à 8-10 semaines) ou âgées (supérieur à 12 semaines) hormis une malformation d'un des reins qui semble avoir lieu chez quelques souris mâles (dont la récurrence reste encore à déterminer). Ces reins malformés sont œdémateux, transparents et composés de cellules apoptotiques observées en coupes histologiques. Ce problème de malformation rénale est compatible avec la vie de la souris du fait qu'un seul rein fonctionnel est suffisant pour maintenir la souris en vie. Les voies de signalisation nécessaires à la formation du rein lors de l'embryogenèse sont les voies de signalisation Wnt/ β -caténine, BMP, *sonic hedgehog* (shh) et la voie *fibroblast growth factor* (FGF) (Reidy et Rosenblum 2009). *Rinf* étant un inhibiteur de la voie du TGF- β (BMP) et Wnt/ β -caténine, il est possible que sa suppression empêche le développement rénal. Toutefois, la récurrence de mutation semblant faible et sexe-spécifique, il est possible que *Rinf* ne soit pas directement impliqué dans cette signalisation permettant la formation rénale mais qu'il contrôle un gène intermédiaire soumis à empreinte et ciblé chez le mâle. Lors du développement du rein, il est également montré qu'une expression non contrôlée de la signalisation BMP entraîne un défaut de formation du rein ainsi que des foyers d'apoptose compatibles avec le phénotype que nous avons observé (Nishinakamura et Sakaguchi 2014). Enfin, *rinf* a été montré comme essentiel au développement rénal chez le poisson-zèbre. Le gène *rinf* serait un gène cible et un effecteur important de *wt1*, un facteur de transcription essentiel au développement embryonnaire rénal (M. S. Kim et al. 2010).

Les souris $Rinf^{-/-}$ sont peu fertiles

Nous avons mis en évidence un défaut de fertilité chez 100% des souris femelles *Rinf^{f/-}*. Leur phénotype est similaire à de l'hydroméetrocolpose. Ces souris présentent ainsi un hymen non perforé ainsi que la présence d'un liquide dans les cornes utérines. Il arrive qu'une des deux cornes utérines soit dysplasique avec une récurrence supérieure pour la corne droite. Il est possible que *Rinf* soit impliqué dans une signalisation des œstrogènes (Yaşar, Ayaz, et Muyan 2016), une hormone importante du développement de l'appareil reproducteur de la femelle. *Rinf* disposant d'un élément de réponse aux œstrogènes dans son promoteur, il est possible que sa suppression interfère avec cette signalisation du moins à une étape du développement. Il

serait intéressant d'étudier le mécanisme d'action mis en jeu, une hypothèse bien que farfelue serait l'absence de l'effet pro-apoptotique de *Rinf* lors de la formation de l'hymen, créant une cloison. La perte de *Rinf* pourrait aussi favoriser un processus de cicatrisation et conduire à la fermeture de la cloison vaginale. Il serait intéressant de regarder si dans des cas cliniques d'hydroméetrocolpose, *RINF* est diminué ou muté au niveau de ces tissus humains.

Chez les souris mâles, nous avons observé un défaut de structuration des tubes séminifères pouvant interférer avec le processus de spermatogenèse et conduire à un problème de fertilité. Nous savons également que l'expression de *Rinf* varie au cours de la spermatogenèse, montrant qu'il peut avoir un rôle au cours de celle-ci (données non montrées). Cependant ce phénotype n'est pas retrouvé chez tous les mâles homozygotes et les autres sont fertiles.

Nous n'avons pas effectué d'examens des organes chez la souris invalidée de manière conditionnelle. Nous savons que le promoteur *Vav* est aussi faiblement exprimé au niveau des organes sexuels et peut par conséquent invalider *Rinf* dans un tissu autre qu'hématopoïétique, que ce soit chez la femelle ou chez le mâle. Ces souris pourraient ainsi avoir le même défaut de fertilité. Il serait intéressant de collecter davantage de données de recensement quant à la prévalence de ces défauts de formation et pourquoi pas étudier les différentes voies de signalisation mises en jeu.

2. Impact de la perte de *Rinf* dans l'hématopoïèse murine

La difficulté à obtenir des souris *Rinf* homozygotes n'a pas facilité l'étude de l'hématopoïèse murine. Après une meilleure connaissance du phénotype de viabilité et de fertilité de ce modèle murin, nous avons pu entreprendre des croisements de souris KO x Het en croisant des mâles fertiles homozygotes avec des femelles hétérozygotes, permettant d'enrichir les portées en souris *Rinf*^{-/-}. Avant d'étudier l'érythropoïèse murine (dans laquelle *Rinf* ne semble pas être exprimé de la même manière que lors de l'érythropoïèse humaine), nous avons entrepris des comptes et pesées des organes hématopoïétiques murins et étudié le répertoire hématopoïétique des progéniteurs et cellules souches hématopoïétiques. De ces résultats préliminaires, la perte de *Rinf* ne semble pas impacter les progéniteurs hématopoïétiques (EMP, CMP, GMP), mais pourrait impacter les cellules souches hématopoïétiques (LSK). De plus, des

MO totales mises en méthyl (données non montrées) donnent un nombre réduit de colonies totales laissant penser que ces LSK, bien que plus nombreuses, seraient moins efficaces à se différencier ou à se maintenir. Si cela était confirmé, il serait essentiel d'effectuer des tests de reconstitutions de ces LSK dans des souris hôtes préalablement irradiées afin de voir si leur capacité d'autorenouvellement et de différenciation en est affectée.

De façon intéressante, nous avons observé une expression forte de *Rinf* au niveau des progéniteurs hématopoïétiques les plus immatures et surtout chez les LSK (PCR en temps réel réalisée dans des progéniteurs hématopoïétiques triés par cytométrie en flux chez des souris WT). Nous avons également montré que les profils d'expressions de *Rinf* et de *Smad7* corrélaient dans ces progéniteurs (**Figure S10**). De plus, la perte de *Rinf* dans des souris homozygotes entraîne une diminution de *Smad7* dans de la moelle osseuse totale, suggérant ainsi qu'un tel mécanisme d'action observé chez l'homme pourrait être conservé dans le tissu hématopoïétique murin. Il serait intéressant d'effectuer des expériences de tri cellulaire des progéniteurs hématopoïétiques mais cette fois dans des souris homozygotes *Rinf*^{-/-} afin de mettre en évidence (par qPCR en temps réel) une perte éventuelle d'expression de *Smad7* dans différents sous types cellulaires.

La diminution de *Smad7* dans le tissu hématopoïétique murin homozygote laisse supposer une augmentation ou une sensibilisation des cellules souches hématopoïétiques (et progéniteurs) à la signalisation du TGF- β . Ces hypothèses peuvent être également testées plus rapidement par des expériences d'étude du cycle cellulaire sur des LSK homozygotes triées par cytométrie en flux (et/ou mise en culture). Ainsi, il se pourrait que la sensibilité des LSK au TGF- β diminue la quiescence et la capacité d'autorenouvellement de ces cellules (Jiang et al. 2018). A l'inverse, la surexpression de *Smad7* favoriserait l'autorenouvellement des LSK (Blank et al. 2006)

Il est à noter que nous n'avons pas présenté la répartition cellulaire de la moelle des souris *Rinf*^{-/-}, bien que la composition des progéniteurs CMP, GMP et EMP ne varie pas entre les souris *Rinf*^{+/+} et *Rinf*^{-/-}, nous n'avons pas étudié la lymphopoïèse. *Rinf* étant fortement exprimé au cours de la lymphopoïèse murine (**Figure S7**), ce compartiment pourrait être impacté chez les souris *Rinf*^{-/-}.

3. Y a-t-il une perte de *Smad7* dans d'autres tissus (non hématopoïétiques) ?

Après la mise en évidence du mécanisme d'action de RINF dans l'érythropoïèse humaine et de la diminution de *Smad7* dans la MO totale des souris *Rinf* homozygotes, nous avons entrepris de vérifier l'expression de *Smad7* et de le comparer aux mêmes organes de souris WT. De notre expérience pilote, le niveau de *Smad7* dans l'ovaire des souris femelles homozygotes est diminué (tendance à confirmer). Ce résultat suggère qu'il est tout à fait possible que le mécanisme par lequel *Rinf* active *Smad7* coexiste dans différents tissus non hématopoïétiques. Ce modèle murin pourrait être intéressant pour l'étude du TGF- β dans d'autres tissus et même lors du développement de ces tissus (pendant l'embryogenèse).

L'étude des connaissances actuelles des souris invalidées pour *Smad7* pourrait également apporter des réponses quant à l'étude de notre modèle murin (Tojo et al. 2012). Il a par exemple été mis en évidence que les souris invalidées pour la partie MH2 de la protéine *Smad7* avaient un défaut majeur de développement cardiaque (entraînant un fort taux de mort embryonnaire) (Q. Chen et al. 2009). Les causes exactes de la létalité embryonnaire de notre modèle KO n'ont pas encore été établies, il serait intéressant d'effectuer des accouplements contrôlés puis des dissections/biopsies d'embryon homozygotes à différents stades du développement embryonnaire afin d'avoir davantage d'information sur le dysfonctionnement délétère chez ces souris.

Discussion générale

1. Compte-tenu de son rôle de modulateur du TGF- β , *RINF* pourrait impacter d'autres lignages hématopoïétiques que le lignage érythroïde

Mes travaux de thèse ont permis de démontrer l'impact de *RINF* dans l'érythropoïèse humaine et de l'hématopoïèse murine. Pour poursuivre cette étude, il serait intéressant d'étudier le rôle éventuel de *RINF* dans d'autres voies de l'hématopoïèse, en priorisant celles modulées par la signalisation TGF- β (**Figure 18**). C'est par exemple le cas de la mégakaryopoïèse, et de la différenciation de cellules immunitaires tels que les lymphocytes B et Lymphocytes T, les DC ou les NK.

Le mécanisme d'action de *RINF* dans la granulopoïèse pourrait également agir par le biais de SMAD7 et du TGF- β . En outre, des travaux ont suggéré que SMAD6, un I-SMAD d'homologie proche de SMAD7, était nécessaire à la différenciation de la lignée HL-60 (Glesne et Huberman 2006). En accord avec l'hypothèse de l'intervention d'un autre I-SMAD, il a également été suggéré que la perte d'expression de SMAD6, comme nous l'avons montré pour SMAD7 (*via* un sh*RINF*), accélère aussi la maturation érythroïde des CD34⁺/CD36⁺ en culture primaire (Kang et al. 2012).

L'expression de *RINF* semblant être ubiquitaire, notre modèle de souris invalidée pour *Rinf* pourrait être un modèle de choix pour l'étude de la fonction du TGF- β sur son microenvironnement. Par exemple, les expériences de reconstitution à long terme (LTR) effectuées avec les LSK de souris homozygotes qui pourraient également être réimplantées dans une souris hôte *Rinf* homozygotes (préalablement irradiée). La niche hématopoïétique étant aussi sensible au TGF- β la reconstitution de LSK venant de souris WT peut se comporter différemment si elle est réimplantée dans une souris *Rinf* homozygote. Il en va de même pour les autres environnements tel que le thymus (pour le développement des LT).

La perte de RINF joue-t-elle un rôle dans des conditions d'érythropoïèse de stress ?

Bien que nous ne l'ayons pas encore étudié, il serait intéressant d'étudier la part ou la contribution de RINF au cours d'un besoin soutenu, comme l'érythropoïèse de stress. Bien que RINF ne semble pas être exprimé dans l'érythropoïèse murine (mais seulement dans les progéniteurs) dans des conditions homéostasiques, il serait intéressant d'utiliser de la phénylhydrazine (agent chimique causant une hémolyse brutale) sur les souris *Rinf*^{-/-} afin d'observer la capacité de reconstitution érythroïde des souris *via* une érythropoïèse de stress, qui a lieu dans la rate de cet animal. Si une différence est observée, il serait intéressant de reproduire la même expérience cette fois dans le modèle de souris spécifiquement invalidée pour *Rinf* dans le tissu hématopoïétique, *via* un promoteur Vav-Cre, afin de voir si cette différence d'érythropoïèse de stress est créée par la perte de *Rinf* dans l'hématopoïèse ou dans l'environnement splénique (ou MO).

Chez l'homme, l'érythropoïèse de stress ne serait pas « extramédullaire » comme chez la souris. Elle aurait cependant une hématopoïèse semblable à l'hématopoïèse fœtale, notamment en entraînant une synthèse d'HbF. Les travaux princeps de Zermati et al, 2000 ont suggéré par des expériences sur HPLC que l'ajout de TGF- β 1 à des érythroblastes primaires en culture liquide ne modifiait pas le ratio HbF/HbA provenant de sang de CB ou de MO, suggérant ainsi que le TGF- β 1 ne stimulerait pas une érythropoïèse de stress. Nous n'avons pas analysé les globines HbA/HbF lors de nos expériences en culture de cellules primaires et il serait intéressant de le faire. Si le TGF- β 1 n'est pas responsable de l'érythropoïèse de stress chez l'humain, *SMAD7* étant une cible de RINF, il est possible que sa perte agisse et favorise d'autres signalisations pouvant produire une érythropoïèse de stress. Il serait également intéressant de tester d'autres cytokines de la superfamille du TGF- β (BMP et activine) afin de voir si la perte de *RINF* (donc de *SMAD7*) a un effet sur ces signalisations, comme l'on peut raisonnablement s'y attendre.

2. RINF un régulateur épigénétique probable

Bien que de nombreux articles et évidences expérimentales proposent RINF comme un probable régulateur épigénétique (Ko et al. 2013) (Shixin Ma et al. 2017), aujourd'hui encore son mécanisme d'action semble encore à déterminer. Il apparaît que son action semble réguler la 5-hmC, faisant de lui un régulateur épigénétique. Pendant ma thèse, j'ai participé à des travaux montrant aussi bien en dot-blot, en immunofluorescence et en cytométrie en flux que la perte de RINF (médiée par shARN RINF) augmentait le niveau global de 5-hmC du génome dans la lignée érythroleucémique K562 (données non montrées). Bien que nos résultats aillent dans le sens où RINF semble bloquer l'action des TET et favoriserait ainsi une augmentation de la 5-hmC, nos résultats rendent compte de changement d'hydroxyméthylation de l'ADN au niveau global et ne rendent pas compte de la 5-hmC au niveau de promoteurs spécifiques. Il serait intéressant d'étudier plus en profondeur ce mécanisme d'action. Il est également possible que la régulation de *SMAD7* par RINF se fasse de manière 5-hmC dépendante. Pour répondre à cette question, une étude du promoteur de *SMAD7* pourrait être réalisée, sans nécessairement requérir au séquençage global de l'ADN.

De manière intéressante, les travaux de Xu *et al.* 2018 (**Figure 22**) ont étudié les affinités de liaison à l'ADN des 15 protéines à doigt de zinc CXXC. Ils ont suggéré que RINF (CXXC5) aurait une affinité de liaison au niveau des CpG mais également des CpT, CpA ainsi qu'au niveau des CpmC (une cytosine 5-mC). De cette dernière observation, de nouveaux champs d'action se présentent à RINF. Il est possible que sa seule présence sur un motif CpmC bloque l'action des enzymes TET possédant un CXXC tels que TET1 et TET3 (empêchant ainsi l'hydroxyméthylation de l'ADN). Dans un autre contexte RINF a été décrit comme servant de plateforme à TET2 pour activer *Irf7* dans des pDC murins (Shixin Ma et al. 2017), il est possible, connaissant l'affinité de RINF/CXXC5 pour les motifs CpmC, que ce mécanisme d'action soit envisageable. Ainsi, on aurait un mécanisme par lequel RINF empêcherait l'activité des enzymes TET1 et TET3 par compétition de fixation aux CpmC, tout en servant de plateforme à TET2 pour permettre son action de déméthylation.

3. Implication de RINF dans les cancers

La plupart des tumeurs présentent des altérations de la voie de signalisation au TGF- β (Zhao, Mishra, et Deng 2018) (Markowitz et al. 1995) (Eppert et al. 1996, 2). Les mutations s'observent plus fréquemment dans les récepteurs (TGF β RI ou RII), ou ses effecteurs (SMAD2 ou SMAD4), voire dans ces gènes cibles responsables de l'arrêt du cycle cellulaire (cycline, ...). Sur la base de la signalisation que nous avons mise en évidence, nous pouvons raisonnablement supposer que des mécanismes activant l'expression de RINF confèrent à certaines cellules tumorales, une capacité accrue à proliférer dans un environnement riche en TGF β , voire à d'autres cytokines de sa superfamille. La forte expression de RINF étant augmentée dans certaines tumeurs (LAM et cancer du sein), il serait intéressant de déterminer si ces tumeurs présentent une plus forte expression de *SMAD7*, et expliquer, du moins en partie, une fonction pro-proliférative de RINF dans ces cellules et un caractère de mauvais pronostic.

Il s'est également avéré que CXXC4 le paralogue de CXXC5 est retrouvé impliqué dans le cancer. De par son interaction avec DVL permettant de réguler négativement la voie WNT/ β -caténine, il est reconnu comme impliqué dans certains cancers du côlon (Paez D 2012), (Yu F 2018), dans les carcinomes rénaux (Kojima et al. 2009), les SMD (Gelsi-Boyer et al. 2009), les cancers de la prostate (Filleur et al. 2009) (trouver autres, plus récents). CXXC4 ayant également un même rôle que RINF, indépendamment de la voie WNT/ β -caténine, comme étant aussi pro-apoptotique *via* FOXL2, il est possible que ces deux protéines aient une contribution du même ordre vis-à-vis du cancer.

4. RINF et mécanisme d'action général

Un grand nombre d'articles dans la littérature place le mécanisme d'action principal de RINF comme étant inhibiteur de la voie Wnt/ β -caténine. Nous avons ainsi mis en évidence un nouveau mécanisme d'action pouvant aussi bien être en accord avec ce premier mécanisme décrit. RINF semble avoir une expression cytoplasmique ou nucléaire différente selon le contexte cellulaire. Les deux mécanismes d'action de RINF mis à jour (interaction avec DVL/ β -caténine ou une régulation transcriptionnelle de *SMAD7*) dépendent tous deux exclusivement

de son motif en doigt de Zinc. Il a été rapporté que la séquence NLS initialement décrite à proximité du doigt de zinc (M. Zhang et al. 2009b) (Pendino et al. 2009) fait partie intégrante de celui-ci (Xu et al. 2018). Ainsi, il est possible que l'interaction du motif CXXC de RINF avec DVL (ce qui inhiberait la voie Wnt/ β -caténine) dans le cytoplasme, masque la séquence NLS, empêchant ainsi la protéine RINF de se délocaliser dans le noyau. En absence de DVL, RINF se délocaliserait dans le noyau pouvant ainsi se lier aux CpG *via* son doigt de zinc et activer ses cibles transcriptionnelles. Cette première hypothèse implique une coexistence de ces deux mécanismes d'action distincts de RINF, en tant qu'inhibiteur de la voie Wnt- β /caténine et du TGF- β .

Une autre hypothèse également possible permettrait de réconcilier une fonction d'inhibition de la voie WNT (décrites dans de nombreuses études) avec un mécanisme d'action transcriptionnel. Elle implique une interaction croisée entre ces deux voies de signalisation par le biais d'une activation transcriptionnelle de *SMAD7*, celui-ci inhibant ensuite la voie WNT. Dans un modèle murin où l'expression de *SMAD7* est induite dans les kératinocytes, il a été mis en évidence une interaction entre *SMAD7* (avec l'aide de *SMURF2*) et la β -caténine, induisant la dégradation de la β -caténine *via* le recrutement d'une E3 ubiquitine ligase (Han et al. 2006). Il serait intéressant de voir si ce mécanisme est également plausible dans d'autres tissus, RINF étant également décrit comme un inhibiteur de la voie Wnt/ β -caténine, ce mécanisme ainsi mis en évidence montre un senseur supplémentaire ainsi qu'un lien entre notre nouveau mécanisme de RINF en tant qu'inhibiteur de la voie du TGF- β et de la voie Wnt/ β -caténine (**Figure S11**).

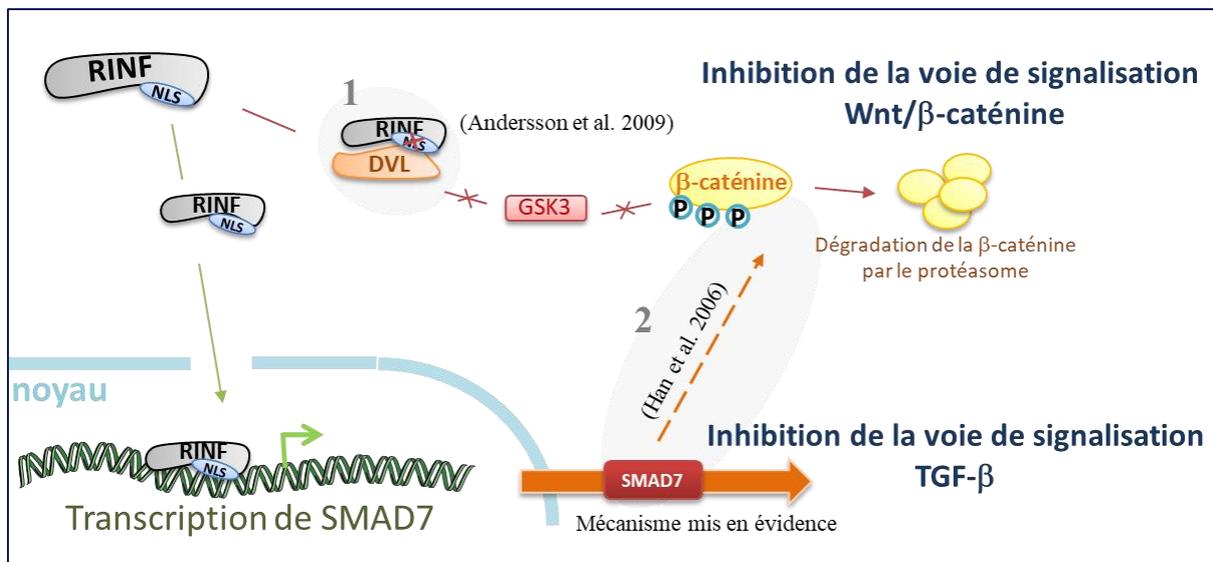


Figure S11 : Schéma proposé du mécanisme d'interaction avec la voie de signalisation Wnt/β-caténine. Il a initialement été démontré une interaction physique, protéine/protéine entre RINF (au niveau de son doigt de zinc) avec DVL, qui a pour effet d'empêcher la signalisation Wnt/β-caténine (1). La mise à jour apporté par notre mécanisme d'action permet également de proposer un autre mécanisme d'interaction indirect de RINF sur la voie Wnt/β-caténine par l'intermédiaire de SMAD7 (2).

Annexes

Article 1

CXXC5 (RINF) loss-of-expression accelerates human erythroid differentiation in a TGFβ- and SMAD7-dependent manner.

Audrey Astori,^{1-5#} Gabriel Matherat,^{1-4#} Emilie-Fleur Gautier,¹⁻⁴ Didier Surdez,⁶ Yaël Zermati,¹⁻⁴ Sakina Zaidi,⁶ Vincent Feuillet,¹⁻³ Hélène Baski,¹⁻⁴ Amir Kadi,¹⁻⁴ Agnès Le Bon,¹⁻³ Frédérique Verdier,¹⁻⁴ Evelyne Lauret,¹⁻⁴ Eric Nguyen,^{3,5} Olivier Delattre,⁶ Valérie Dumaine,⁷ Carine Lefèvre,¹⁻⁴ Michaela Fontenay,¹⁻⁴ Øystein Bruserud,^{8,9} Evelyne Ségal-Bendirdjian,^{3,5} Isabelle Dusanter-Fourt,¹⁻⁴ Patrick Mayeux,¹⁻⁴ and Frédéric Pendino.¹⁻⁵

¹Inserm, U1016, Institut Cochin, Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, F-75014, Paris, France; ²CNRS, UMR8104, F-75014, Paris, France; ³Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; ⁴Department of Development, Reproduction, and Cancer, Institut Cochin, F-75014, Paris, France; ⁵Inserm, U1007, Centre Universitaire des Saints-Pères, F-75006, Paris, France; ⁶Institut Curie, PSL Research University, Inserm U830, Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, SIREDO Oncology Center, 26 rue d'Ulm, F-75005 Paris, France; ⁷Service de Chirurgie Orthopédique, AP-HP, Hôpital Cochin, Paris, France. ⁸Section for Hematology, Department of Clinical Science, University of Bergen, Norway; ⁹Department of Medicine, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway.

These two authors contributed equally to this work.

Short title for the running head: *CXXC5 loss-of-function accelerates erythropoiesis*

Text word count: **3949** Abstract word count: **206**

Number of tables: **0** number of figures: **7**, supplemental methods: **1**, supplemental tables: **2**, supplemental figures: **5**, number of references: **59**, number of pages: **24**

Correspondence: Frédéric Pendino, PhD
Institut COCHIN,
Inserm U1016 - CNRS 8104 - Université Paris Descartes UMR-S1016
Bâtiment Gustave Roussy (7^{ème} étage)
27, rue du Faubourg Saint-Jacques
75014 PARIS, FRANCE
Phone: +33 1 40 51 64 03 Fax: +33 1 40 51 65 35
Email: frederic.pendino@inserm.fr

Scientific Category: *Red cells, Iron, and Erythropoiesis.*

Key points:

- Retinoid-Induced Nuclear Factor (RINF) binds to the promoter of *SMAD7* and upregulates its gene expression in a transcriptional manner
- *CXXC5 loss-of-function* downregulates *SMAD7* and sensitizes human erythroid progenitors to autocrine TGFβ-induced growth inhibition

Abstract

The *Retinoid-Inducible Nuclear Factor* (*RINF*, also known as *CXXC5*) gene, located at chromosome band 5q31, has been proposed as a candidate tumor suppressor gene in hematopoietic malignancies. Here, we show that *RINF* is expressed in erythroid progenitors and downregulated at both protein and mRNA levels during human erythropoiesis driven *in vitro*. *RINF*-knockdown of purified human primary CD34 positive hematopoietic cells did not alter cell viability but accelerated erythropoietin-driven erythroid maturation, a process leading to a lower production of red blood cells. Deregulation of *RINF* expression also modulates hemoglobinization of K562 and UT7_{5.3} cell lines treated with hemin and erythropoietin, respectively. A comparative transcriptomic analysis of these *RINF*-silenced cells revealed an enrichment in TGF β target genes and *SMAD7* as a promising *RINF* target gene candidate. *SMAD7* overexpression efficiently abolished the acceleration of hemoglobin production induced by *RINF*-knockdown in K562 cells. At the molecular level, *RINF* binds to *SMAD7* promoter and upregulates *SMAD7* gene expression. In primary CD34+ hematopoietic cells, *RINF* knockdown attenuated *SMAD7* mRNA expression and the resulting acceleration of erythropoiesis was abolished by TGF β inhibitors. Consequently, we propose a model in which *RINF* loss-of-expression would exacerbate the sensitivity of human erythroid progenitors to autocrine/paracrine TGF β -induced growth inhibition, and thus, blunts the expansion of the erythroid pool.

Introduction

A growing number of studies have suggested the involvement of Retinoid-Inducible Nuclear Factor (RINF, *alias* CXXC5) during the maturation of various cell types such as neural stem cells,¹ endothelial cells,² myoblasts,³ myofibroblasts,⁴ as well as in the development of gonads,^{5,6} and kidney.⁷ However, its role in normal hematopoiesis has hitherto been poorly investigated. We have previously shown that *RINF* expression is required for retinoid-induced terminal differentiation of myeloid leukemia cells (NB4, HL60) and participates in cytokine-induced granulopoiesis of primary bone marrow CD34+ cells.⁸ However, its contribution to other hematopoietic lineages, such as the erythroid lineage, on which retinoids may also intervene,⁹⁻¹¹ remains unknown.

In keeping with its gene location at chromosome 5q31.2, a commonly deleted region in myeloid neoplasms, *RINF loss-of-function* has been proposed to contribute to (pre)leukemia development.^{8,12-15} *RINF* mRNA expression is an unfavorable^{16,17} and independent¹² prognostic factor in acute myeloid leukemia (AML). We also suggested its involvement in solid tumors such as breast cancer, thyroid cancer, and malignant melanoma.¹⁸ An independent study suggested its role in prostate cancer.^{19,20}

At the molecular level, the exact mode of action of RINF is not fully elucidated and depends on the cellular context. RINF can inhibit the WNT- β -catenin signaling pathway^{1,4,7,12,21} through a cytoplasmic interaction with Dishevelled proteins DVL and DVL2.¹ However, in most of the studies the subcellular localization of RINF protein is mainly or exclusively nuclear. RINF contains a Nuclear Localization Signal⁸ that has been functionally validated.²² RINF can bind ATM and mediate DNA-damage induced-activation of TP53.^{12,22} Moreover, RINF strongly associates with chromatin⁸ through its conserved zinc-finger domain (CXXC) that plays a central role and provides the capacity to bind CpG islands.²³ This domain is almost identical to the one harbored by TET1, TET3, and IDAX (CXXC4, a TET2 inhibitor), three epigenetic modulators suggested to be involved in the erasure of DNA-methylation marks.²⁴ Thus, RINF could interfere with TET-activities, hydroxymethylation, and gene transcription.^{25,26} Several independent studies suggested that it could act as a cofactor of transcription.^{2,5,8,27-29}

Transforming growth factor β (TGF β) is a strong and widespread inhibitor of cell growth in various mammalian tissues.^{30,31} TGF β regulates hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) and is described as a potent erythroid differentiation inducer

and inhibitor of cell proliferation.^{32,33} TGF β signals through cell surface serine/threonine kinase receptors, mainly TGF β RI and TGF β RII. Activated TGF β RI phosphorylates SMAD2 and SMAD3 that move into the nucleus and form complexes that regulate transcription of target genes. TGF β can also elicit its biological effects by activation of SMAD-independent pathways.^{34,35} Inhibitory SMADs (SMAD6 and SMAD7) inhibit TGF β signaling. A reduced *SMAD7* expression sensitizes cells to the antiproliferative effects of TGF β and contributes to anemia in patients suffering from Myelodysplastic Syndromes (MDS).^{36,37}

In the present work, we demonstrate that RINF interferes with erythropoiesis of human HSPCs. By using both primary CD34 positive cells and cell lines (K562 and UT7_{5.3}), we demonstrate that RINF expression affects human erythropoiesis by regulating *SMAD7* expression, the main inhibitor of TGF β signaling.

Methods

Primary culture of hematopoietic cells.

Mononuclear cells were isolated from cord blood (CRB Saint-Louis Hospital, Paris) or adult bone marrow donors after written informed consent for research use was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki. The ethics evaluation committee of the Institute of Medical Research and Health (Inserm) has reviewed and approved the research project (IRB0003888). Mononucleated cells were separated by Ficoll-Paque (Life Technologies) and purified with human CD34 MicroBead Kit (Cat.N°130100453, Miltenyi Biotec). A two-step culture method for cell expansion and erythroid differentiation was used to obtain highly stage-enriched erythroblast populations.³⁸ Briefly, CD34⁺ cells (purity 94-98%) were cultured 7 days with IL6, IL3 (10 ng/mL), and SCF (100 ng/mL) to expand hematopoietic progenitors.³⁸ CD36⁺ erythroid progenitors were purified using magnetic microbeads (CD36 FA6.152 from Beckman Coulter and anti-mouse IgG1 MicroBeads from Miltenyi Biotec). Then, erythropoietin (EPO) was added during 8-12 days to allow erythroid differentiation. For Colony-Forming Cells (CFC, counted at 11-14 days) assays, CD34⁺ hematopoietic stem cells were seeded in methylcellulose (H4034, StemCell Technologies). TGFβRI inhibitor SB-431542 was from Selleckchem (Cat.N°S1067).

Flow Cytometry and differentiation analysis

To monitor end-stage erythroid differentiation of primary cells, cells were labeled with anti-human PE/Cy7-conjugated CD235a (Cat.N°A71564), PE-conjugated CD71 (IM2001U), and APC-conjugated CD49d (Cat.N°B01682) from Beckman Coulter, PC5-conjugated CD71 from BD Pharmingen (Cat.N°551143), PE-conjugated CD233/Band3 from IBGRL (Cat.N°9439-PE), FITC-conjugated CD36 from eBioscience (Cat.N°11-0369-42). FACS (fluorescence-activated cell sorting) analysis was performed on an Accuri™ C6 Flow Cytometer (Becton-Dickinson). For morphological characterization cells were cytospun and stained with May-Grünwald-Giemsa method (MGG). For benzidine assay, $2 \cdot 10^5$ cells were incubated for 5 minutes with 0.01% benzidine and H₂O₂ at 0.3% (Sigma-Aldrich).

Culture of cell lines and treatments

K562 (ATCC#CCL243) and UT7_{5.3}³⁹ cells were cultured in RPMI 1640 medium and minimum essential medium (MEM α) supplemented with 2.5 ng/mL of GM-CSF (Myltenyi Biotech), respectively. Both medium were supplemented with 10% of inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-Glutamine, 50 units/ml penicillin G and 50 μ g/mL streptomycin (Life Technologies). To induce hemoglobin production, K562 cells were treated with hemin at 40 μ M (Sigma-Aldrich). Erythroid maturation of UT7_{5.3} was triggered by replacing GM-CSF with EPO 5U/ml.

Lentiviral and Retroviral transduction of hematopoietic cells

For shRNA-mediated *RINF* knockdown, two lentiviral vectors were used, the previously described pLKO.1/puroR vector⁸ or the pTRIPDU3/GFP vector,⁴⁰ which drives the same shRNA sequences downstream of H1 promoter. For *RINF* overexpression, the retroviral vector MigR/IRES-GFP was used with experimental conditions as previously described.⁸ Green fluorescent protein (GFP) sorting was performed on a FACSAriaIII (BD Biosciences). For *SMAD7* overexpression, the retroviral vector pBABE-puro-SMAD7-HA (Addgene plasmid#37044) was used with experimental conditions as previously described.^{8,41}

Statistical analyses

Contingency tables were performed by using the Fisher's exact test (benzidine staining, CFC assays), chi-square test (CD71/GPA, Band3/CD49d-staining), or Spearman correlation coefficient by using the GraphPad Prism v6.01 software. Significance of P values are indicated in Figures. Not significant (ns): $p > 0.05$; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.005$; ***: $p < 0.0001$. Error bars represent confidence intervals at 95% (benzidine staining and flow cytometry) or standard deviations (SD) for qRT-PCR analyses.

Quantitative RT-PCR

Cells were collected and directly stored at -80°C for RNA preparation with TRIzol (Life technologies) extraction protocol as previously described.⁸ First-strand cDNA synthesis (RT) were carried out using Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Cat.N°489703000, Roche). *RINF* mRNA expression was detected using Lightcycler® 480 ProbesMaster kit (Cat.N°4707494001, Roche). Relative mRNA expressions were normalized to *RLPL2* or *PPIA* gene expression in a two-color duplex reaction. For *SMAD7*, *PU.1* and *c-KIT* mRNAs detection, quantitative PCRs were performed using

SYBRGreen. qRT-PCR were performed on a Light Cycler 480 machine (Roche). Primer sequences are available in a supplementary file.

Western-blot analysis

Total cell extracts and western blotting were carried out as previously described.⁸ Blots were incubated with primary polyclonal antibody and then with appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-rabbit and anti-mouse IgG HRP antibodies from Cell Signaling, Cat.N°7074S, Cat.N°7076S) and anti-goat IgG HRP antibody from Southern Biotech (Cat.N°6160-05). Detection of proteins was performed using chemiluminescent detection system (clarity western ECL, Cat.N°170-5060, Biorad). Rabbit polyclonal antibodies were previously described for RINF,⁸ P85 (PI3KR1),⁴² or commercially purchased for anti-RINF, anti-SMAD7 (Cat.N°16513-1-AP, Cat.N°25840-1-AP, ProteinTech), anti- β -ACTIN (ACTB, Cat.N°A1978, Sigma-Aldrich) and anti-HSC70 mouse monoclonal antibody (SC-7298, Santa Cruz Biotechnology).

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) experiments

ChIP was performed with anti-RINF (ProteinTech, Cat.N°16513-1-AP) or anti-H3K4me3 (Diagenode, Cat.N°C15410003), antibodies using iDeal ChIP-seq Kit for Transcription Factors (Diagenode) following manufacturer's instructions and using the following options: K562 cells were crosslinked with 1% formaldehyde for 10 minutes in fresh media at room temperature and quenched with 0.2 M glycine for 5 additional minutes. Chromatin was sonicated using Diagenode Bioruptor (Power High, 20 cycles of 30"on-30"off and by changing ice cold water in the bath every 5 cycles). Sonication was validated by agarose gel electrophoresis (average DNA size ~150-250 bp) using an aliquot of purified sheared chromatin (proteinase K treated followed by and phenol-chloroform extraction). Quantitative-PCR was performed using Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Cat.N°4367659) using pairs of primers encompassing six regions (R0-R5) of *SMAD7* gene. R0 and R5 regions were used as negative controls. The efficiency of chromatin immunoprecipitation at these loci was determined as the recovery of that locus calculated as the percentage of the input (the relative amount of immunoprecipitated DNA compared to input DNA). The amount used for the input was 1% of the amount used for ChIP, the recovery was calculated as follows: % recovery = $2^{(C_t^{\text{input}} - C_t^{\text{sample}})}$.

Methods for "Flow cytometric cell sorting of MEP cells" and "primer sequences" are described in a Supplemental file.

Results

RINF protein is downregulated upon terminal erythroid differentiation. RINF expression was evaluated during cytokine-induced erythroid differentiation of CD34+ progenitors isolated from human cord blood or adult bone marrow. To obtain highly enriched populations of differentiating erythroblasts, cells were grown in a two-phase liquid culture method (experimental design in Figure 1A) as previously described.^{38,43} RINF protein was detected at the earliest stages of erythroid differentiation (enriched in progenitors and early erythroblasts) and reached its highest level around the proerythroblast (ProE) stage (Figure 1B). After that, RINF protein drops from the basophilic erythroblast stage and was barely detectable in late erythroblasts (i.e. polychromatic and orthochromatic erythroblast stages). Similarly, *RINF* mRNA level was abundant in erythroid progenitors and drops from the basophilic stage (Figure 1C). This trend was also noticed in three independent transcriptome datasets performed by Merryweather-Clarke *et al.*⁴⁴, An X *et al.*⁴⁵, and Keller *et al.*,⁴⁶ respectively (Figure S1). Altogether, *RINF* expression was high in progenitors (enriched in CFU-E) and ProE, and was downregulated from the basophilic erythroblast stage during cytokine-induced erythropoiesis of CD34+ cells isolated from either adult bone marrow or cord-blood.

***RINF* knockdown accelerates erythroid differentiation of human HSPCs.** Since RINF was expressed in normal erythroid progenitors and precursors, we tested the consequences of its knockdown on cell viability and erythropoiesis (Figure 2). The experimental design is indicated in Figure 2A. *Loss-of-function* experiments were performed with the previously described and validated short-hairpin RNAs (shRNA) sequences driven by the lentiviral pLKO.1⁸ or pTRIPDU3/GFP vector.⁴⁰ Extinction of RINF protein (Figure 2B) was noticed as early as two days post-transduction (i.e. at day 0 of EPO) in primary cells transduced with *shRNA-RINF* vector without affecting cell viability (assessed by trypan blue cell counting, not shown). Accordingly, cell growth was not affected until day 10 of EPO (Figure 2C). However, RINF knockdown clearly accelerated erythroid differentiation monitored by morphological analysis (Figure 2D), benzidine staining (Figure 2E), and flow cytometry using erythroid markers (here, GPA and CD71, Figure 2F). The observed differences were statistically significant ($p < 0.0001$) for CD34+ cells isolated either from cord-blood or adult bone marrow. Importantly, shRNA-RINF-induced acceleration of erythropoiesis was also

underpinned by cell size diminution (not shown) and at the molecular level by an earlier downregulation of *c-KIT* and *PU.1* mRNAs in *RINF* knocked-down cells (Figure S2). Of note, this acceleration of maturation was characterized by a reduced number of ProE cells (~2.8-fold less) enumerated at day 10 (Figure 2D).

***RINF* knockdown is associated with an increased erythroid colony forming capacity of human HSPCs.** We previously described the functional contribution of *RINF* to granulocytic differentiation of human hematopoietic progenitors grown in liquid medium supplemented with granulopoietic cytokines.⁸ Clonogenic assays were performed in order to assess its putative involvement to the development and maturation of erythroid (BFU-E), myeloid (CFU-G, CFU-M, or CFU-GM), and mixed colonies (CFU-GEMM). No statistically significant change was noticed in the total number of colonies or the number of CFU-M, CFU-GM, or CFU-GEMM (Figure 3A). However, the number of granulocytic colonies (CFU-G) was reduced ($p < 0.0001$, Fisher's exact test), as expected from our previous liquid cell culture experiments⁸. Moreover, shRNA-mediated *RINF* loss-of-expression was also associated with a statistically significant increase ($p < 0.001$) in the number of BFU-E-derived colonies. These data were observed in CD34 positive cells isolated either from human bone marrow or umbilical cord-blood (Figure 3, B and C), with two types of lentiviral vector and in non FACS-sorted conditions (Figure S3). Importantly, a clear increase in the number of BFU-E-derived colonies was also observed with shRNA-*RINF*-transduced MEP-sorted cells (Figure 3D), indicating that this biological effect was lineage-autonomous and did not occur at the expense of the granulocytic-lineage. Importantly, a careful analysis of colony size demonstrated an increased number of small (more mature) BFU-E in the knocked-down conditions (Figure 3E), in agreement with an accelerated maturation.

***RINF* is downregulated during erythroid maturation of K562 and UT7_{5.3} cells and *RINF* knockdown accelerates cell hemoglobinization.** We then measured *RINF* in two cell line models of erythroid maturation, the K562 cell line treated with hemin or the UT7_{5.3} cell line treated with EPO³⁹ after GM-CSF withdrawal (Figure 4). Interestingly, *RINF* was downregulated upon treatment-induced erythroid differentiation, in agreement with primary cells data. A *RINF* downregulation appeared at the protein level as early as after ten hours of treatment with hemin for K562 cells

(Figure 4A), shown here for cells transduced with shRNA-Control, and also observed with non-transduced cells. For UT7_{5.3} cells, the downregulation was noticed after two days in EPO (Figure 4A and B, lower panel).

Loss-of-function experiments were then performed in order to investigate the consequence of *RINF* knockdown on these two cell lines (Figure 4). No change in cell viability or cell growth was noticed in these two cell lines after gene knockdown. However, as presented in Figure 4B, *RINF* silencing accelerated the erythroid maturation program triggered by hemin in K562, or EPO in UT7_{5.3}. Although the kinetics of erythroid-maturation of the two cell lines were different, an accelerated hemoglobinization was noticed for *RINF* knocked-down cells after one day of hemin treatment for K562 cells and four days of Epo-treatment for UT7_{5.3} cells.

Constitutive overexpression of *RINF* delays hemoglobin production of K562 and UT7_{5.3}. We wondered if *RINF* overexpression could interfere with the kinetics of erythroid differentiation. For this, we used the previously described retroviral system MigR/IRES-GFP vector⁸ (Figure 5A, upper panel) to drive the ectopic expression of full-length *RINF* cDNA. A high constitutive expression of *RINF* was noticed at the protein level for the two cell lines (Figure 5A), without cell toxicity or consequence on cell proliferation (not shown). The consequence on erythroid differentiation was evaluated by benzidine staining (Figure 5B). Importantly, *RINF* overexpression reduced hemoglobinization of the two cell lines ($p < 0.0001$). These data exactly mirror those obtained with knockdown experiments (Figures 4).

***RINF* gene silencing modulates TGF β signaling pathway and *SMAD7* expression in K562 and UT7_{5.3}.** In order to identify the molecular mechanisms by which *RINF* inhibits hemoglobinization and erythroid maturation, we mined into our own gene expression microarray datasets of K562 and UT7_{5.3} transduced cells.¹⁷ Only 193 gene candidates (Supplementary Table S1) were commonly downregulated by *RINF* loss-of-expression in both cell lines (log₂ fold-change cutoff at 1.25). Of note, ingenuity pathway analyses (IPA) revealed that this gene list was enriched in genes belonging to the TGF β signaling pathway (Figure S4). Accordingly, the main effector of this cytokine, SMAD3, appeared at the top of the list of the upstream analysis of IPA (Supplementary Table S2). Considering, (i), its well-known inhibitory function on TGF β

signaling, and (ii), its *loss-of-expression* in MDS, *SMAD7* appeared as a promising candidate to functionally investigate.^{36,37,47} Interestingly, *SMAD7* was also down-regulated by *RINF* knockdown in third hematopoietic cell line, the MV4-11 cell line (Figure S3B).

***SMAD7* overexpression abolishes the acceleration of hemoglobinization induced by *RINF*-knockdown in K562 cells.** In order to demonstrate the functional involvement of *SMAD7* we performed “rescue” experiments. As previously described, endogenous *SMAD7* was too low to be detectable at the protein level in K562 cells.⁴⁷ After retroviral transduction, the ectopic expression of *SMAD7* was visualized at the protein level in K562 cells (Figure 6B). *SMAD7* overexpression did not affect the endogenous expression of *RINF* protein but reduced hemoglobinization of shRNA-Control cells (Figure 6C), mimicking the effect of ectopic *RINF* (Figure 5B). No change in cell viability or proliferation was noticed in absence of hemin. Importantly, shRNA-*RINF*-mediated acceleration of hemoglobinization was not observed when *SMAD7* was ectopically expressed (Figure 6C, lanes 3 and 4).

***SMAD7* is a direct transcriptional target gene of *RINF* protein in K562 cells.** Our qRT-PCR analyses demonstrated an increase (approximately five-fold) of *SMAD7* mRNA level in cells overexpressing *RINF* (Figure 6D). In order to ascertain that *RINF*-mediated induction of *SMAD7* occurred at the transcriptional level, we performed ChIP-experiments with anti-*RINF* antibodies. To this end, five sets of primers were designed in regions encompassing the *SMAD7* promoter (Figure 6E). As shown in Figure 6F, *RINF* protein binds directly to several regions (R1 to R4) of the *SMAD7* promoter and this binding was increased in cells overexpressing *RINF*. Moreover, H3K4me3 histone marks (quantified by ChIP-qPCR) were increased by *RINF* overexpression in four proximal regions (R2-R4) of the *SMAD7* transcription start site, indicating that chromatin was in a more active transcriptional state. Altogether, our data indicated that *SMAD7* is a direct transcriptional target of *RINF* protein.

***RINF* loss-of-expression accelerates erythroid maturation of human hematopoietic progenitors in a TGF β -dependent manner.** In order to validate the involvement of the TGF β signaling during sh*RINF*-mediated acceleration of erythropoiesis, we followed up liquid cell culture experiments of primary CD34+ cells

cultured with SB-431542, a potent and selective inhibitor of TGF β RI (Figure 7A). An accelerated erythroid differentiation process was noticed for RINF knockdown cells in the absence of this drug (compare lane 1 and 2) visualized by a faster acquisition of erythroid cell surface markers such as GPA/CD71 (shown at day 6 of EPO) or CD49d/Band3 (shown at day 10 of EPO). Importantly, this acceleration was inhibited in the presence of the TGF β inhibitor SB-431542 (compare lane 2 and 4 of Figure 7A). In agreement with an important autocrine TGF β signaling in the early stages of erythropoiesis, both TGF β 1 and TGF β RI were highly expressed in our experimental conditions (Figure S5A).

RINF loss-of-expression downregulates SMAD7 mRNA expression of human primary human CD34+ cells. We then wondered whether shRNA-mediated *RINF* knockdown could attenuate *SMAD7* expression in erythroid progenitors. As shown in Figure 7B, a 60-70% knockdown of *RINF* led to a statistically significant knockdown of *SMAD7* (by 40-45%) in CD34 positive cells isolated from cord blood (paired-T-test student $p < 0.001$). We thus wondered if *RINF* and *SMAD7* mRNA expression would correlate in normal adult bone marrow samples. Figure 7C represents the data obtained by q-RTPCR from 11 bone marrow donors. The correlation between *RINF* mRNA and *SMAD7* mRNA was highly significant (Spearman, $\rho = 0.773$, $P = 0.007$). These data were confirmed in an independent microarray dataset performed by Pellagatti A *et al.*⁴⁸, here used as an external confirmatory dataset. As shown in Figure S5, *RINF* and *SMAD7* mRNA levels correlated in CD34+ cells isolated from normal bone marrow of healthy donors (Spearman, 0.7, $p < 0.005$ **).

Discussion

An increasing number of studies suggest that *RINF* is involved in the maturation, function, or development of various cell types and tissues.¹⁻⁸ However, only a few functional studies have analyzed the role of *RINF* in human hematopoiesis.⁸

Our experiments, performed with primary hematopoietic progenitor cells (CD34+) isolated from healthy bone marrow donors or cord blood units, highlight the importance of *RINF* regulation during cytokine-induced erythropoiesis of human progenitors. *RINF* is expressed in progenitors (i.e. BFU-E and CFU-E) and proerythroblasts (ProE). After this stage, *RINF* is strikingly downregulated at both the mRNA and protein levels during *in vitro* erythropoiesis (i.e. from the basophilic stage). Its *loss-of-expression* in progenitors does not alter their viability or clonogenic potential but accelerates their differentiation, as assessed by morphological analysis, cell hemoglobinization, surface markers, increased number of small BFU-E, and molecular markers. Such an accelerated erythroid maturation leads to a diminished expansion of the erythroid pool. This process has been well described *ex vivo* and *in vivo* for TGF β , a potent inducer of erythroid maturation and growth inhibition.^{33,36,37,49,50} We show here that *RINF loss-of-expression* in HSPCs leads to a threefold reduction in the number of ProE generated *in vitro*. By modulating the sensitivity of erythroid progenitors to TGF β , *RINF* could participate to the dynamic balance between expansion of the erythroid pool and production of red cells. Agents that would enhance *RINF* expression are expected to provide resistance to TGF β -induced growth inhibition and, thus, red blood cell expansion. This would be of potential interest to treat anemia that are refractory to current therapies.

Complementing our previous study,⁸ the present data demonstrate that *RINF loss-of-expression* also affects terminal granulopoiesis and the number of CFU-G (CFC assays). This dual role of *RINF*, in both erythroid and granulocytic maturation, is in agreement with previously described functions of retinoids in human progenitors.^{9,10} As a direct retinoid target gene, *RINF* is a good candidate for mediating retinoid signaling in hematopoietic progenitors and stem cells. An increased number of BFU-E-derived colonies was observed with shRNA-*RINF*-transduced MEP-sorted cells (Figure 3C). This indicates that the dual role of *RINF* appears lineage autonomous and not only the consequence of a switch of commitment between erythroid *versus* myeloid lineage. However, one cannot exclude an additional role of *RINF* in the erythroid *versus*

granulo-monocytic lineage choice of multipotent progenitor cells. Supporting the latter hypothesis, *CXXC5/RINF* has been found in the gene network contributing to the cell fate at the erythroid-myeloid bifurcation.⁵¹

Recent studies suggested the implication of genome-wide 5'-hydroxymethylation during erythropoiesis.⁵² TET2 and TET3 play a role during early and late erythropoiesis, respectively.⁵³ The presently described role of RINF may contribute to better understand the molecular epigenetic events occurring during human erythropoiesis, since its putative capacity to interfere with TET enzymes and 5'-hydroxymethylation of CpG has recently been demonstrated.^{25,26} So far, the exact role of RINF on the regulation of 5'-hydroxymethylation remains unclear since it has been described as a TET2-inhibitor in murine ES cells²⁵ and necessary for the TET2-mediated regulation of *IRF7* in mouse plasmacytoid dendritic cells.²⁶

Several correlative studies have suggested *RINF* as a cancer gene candidate that could contribute to MDS/AML.^{8,12,15,54} The fact that *RINF* knockdown attenuates the production of both granulocytes and red blood cells in primary cultures of human progenitors is particularly striking, as cytopenia of these two lineages is observed in MDS patients. MDS is a complex and heterogeneous malignant hemopathy in which the loss of several genes is suspected to lead to the pathophysiology.¹³ *CXXC5* is located at chromosome 5q31.2, at the edge of the 3.7 Mb commonly deleted region (CDR) in myeloid neoplasms with del(5q) and at less than 20kb from *UBE2D2*, the most distal gene encompassing the centromeric CDR.^{8,13} Even though it is unlikely that a *RINF loss-of-expression* alone would be sufficient to lead to preleukemia, our present functional data indicate that the loss of *RINF* may exacerbate the cytopenia of these two lineages. The functional contribution of *Cxxc5/Rinf* invalidation to MDS development has been recently emphasized in an animal model, in which its invalidation (by insertional mutation) has been demonstrated to cooperate with *Egr1*+/- to promote MDS.¹⁴ This study indicates that *Cxxc5* gene could act as a tumor suppressor gene contributing to del(5q) myeloid neoplasms. Although *RINF/CXXC5* is not frequently mutated in patients with MDS/AML,⁵⁴ other recurrent chromosomal anomalies or gene mutations could lead to *RINF loss-of-expression* such as del(5q), or mutations in *GATA2*^{12,17,55} and *WT1* mutation.⁷

At the molecular level, we propose a model in which *RINF loss-of-function* could contribute to *SMAD7* downregulation, and thus, to accelerated erythropoiesis by

sensitizing CD34+ hematopoietic cells to autocrine TGF β . Previous studies have underlined the importance of *SMAD7* regulation in MDS.^{36,37} However, the molecular mechanism by which *SMAD7* was suggested to be regulated depended on a posttranslational mechanism involving expression of miRNA-21. Our present data are complementary and demonstrate a direct transcriptional mechanism by which *SMAD7* is regulated in hematopoietic cells. These data are particularly important in order to better understand the fine-tune regulation of TGF β responsiveness in the bone marrow microenvironment,³² in a cell context-specific manner.^{56,57} We propose a molecular mechanism by which RINF behaves as a negative modulator of TGF β family signaling acting through *SMAD7* upregulation. Such a mechanism will deserve to be investigated in other TGF β -dependent physiological processes such as wound healing,⁴ angiogenesis,² kidney development,⁷ hair-regrowth,⁵⁸ and cancer etiology,^{18,19} or chemoresistance.^{16,17}

Acknowledgements

This work was supported by INSERM, Paris-Descartes University, Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC), Cochin Institute, and SATTidfinnov. AA was supported by LNCC, Société Française d'Hématologie, Fondation pour la Recherche Médicale, and Boehringer Society (travel grant). GM was supported by fellowship grant from the Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche. E.S-B's team work was supported by LNCC and Fondation de France. We are also grateful for the support from the French-Norwegian exchange program (Aurora to F.P. and Ø.B.). Authors thanks Pr. Jérôme Larghero and Thomas Domet from *Centre de Ressources Biologiques / Banque de Sang de Cordon de l'AP-HP* (Saint-Louis Hospital) for providing cord blood units, Anne Dubart-Kupperschmitt for the pTRIPDU3/GFP vector,⁴⁰ Johan Lillehaug, Camille Humbert, Pierre de la Grange (Genosplice), Sabrina Bondu, Alexandre Artus, Franck Letourneur and Brigitte Izac for technical assistance, scientific discussions, and Alain Trautmann for reading the manuscript.

Authorship Contributions

A.A. and G.M. performed most of the experiments. D.S and S.Z performed the ChIP experiments. V.F. and E-F.G. performed some experiments and discussed the data. Y.Z., F.V., E.L., Ø.B., M.F., A.A., G.M., H.B., A.K., A.L.B., E.N., O.D., V.D. and C.L.

discussed the data. E.S-B, I.D-F, and P.M. supervised the study. F.P. conceived the study and supervised the experiments. A.A., G.M., and F.P. analyzed the data and wrote the manuscript.

Conflicts of Interest Disclosures

F.P. is a coinventor of patent applications filed by University of Bergen on *RINF* related technologies.

References

1. Andersson T, Sodersten E, Duckworth JK, et al. CXXC5 is a novel BMP4-regulated modulator of Wnt signaling in neural stem cells. *J Biol Chem*. 2009;284(6):3672-3681.
2. Kim HY, Yang DH, Shin SW, et al. CXXC5 is a transcriptional activator of Flk-1 and mediates bone morphogenic protein-induced endothelial cell differentiation and vessel formation. *FASEB J*. 2014;28(2):615-626.
3. Li G, Ye X, Peng X, et al. CXXC5 regulates differentiation of C2C12 myoblasts into myocytes. *J Muscle Res Cell Motil*. 2014;35(5-6):259-265.
4. Lee SH, Kim MY, Kim HY, et al. The Dishevelled-binding protein CXXC5 negatively regulates cutaneous wound healing. *J Exp Med*. 2015;212(7):1061-1080.
5. L'Hote D, Georges A, Todeschini AL, et al. Discovery of novel protein partners of the transcription factor FOXL2 provides insights into its physiopathological roles. *Hum Mol Genet*. 2012;21(14):3264-3274.
6. May-Panloup P, Ferre-L'Hotellier V, Moriniere C, et al. Molecular characterization of corona radiata cells from patients with diminished ovarian reserve using microarray and microfluidic-based gene expression profiling. *Hum Reprod*. 2012;27(3):829-843.
7. Kim MS, Yoon SK, Bollig F, et al. A novel Wilms tumor 1 (WT1) target gene negatively regulates the WNT signaling pathway. *J Biol Chem*. 2010;285(19):14585-14593.
8. Pendino F, Nguyen E, Jonassen I, et al. Functional involvement of RINF, retinoid-inducible nuclear factor (CXXC5), in normal and tumoral human myelopoiesis. *Blood*. 2009;113(14):3172-3181.
9. Gratas C, Menot ML, Dresch C, Chomienne C. Retinoid acid supports granulocytic but not erythroid differentiation of myeloid progenitors in normal bone marrow cells. *Leukemia*. 1993;7(8):1156-1162.
10. Labbaye C, Valtieri M, Testa U, et al. Retinoic acid downmodulates erythroid differentiation and GATA1 expression in purified adult-progenitor culture. *Blood*. 1994;83(3):651-656.
11. Rusten LS, Dybedal I, Blomhoff HK, Blomhoff R, Smeland EB, Jacobsen SE. The RAR-RXR as well as the RXR-RXR pathway is involved in signaling growth inhibition of human CD34+ erythroid progenitor cells. *Blood*. 1996;87(5):1728-1736.
12. Kuhn A, Valk PJ, Sanders MA, et al. Downregulation of the Wnt inhibitor CXXC5 predicts a better prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2015;125(19):2985-2994.
13. Stoddart A, Nakitandwe J, Chen SC, Downing JR, Le Beau MM. Haploinsufficient loss of multiple 5q genes may fine-tune Wnt signaling in del(5q) therapy-related myeloid neoplasms. *Blood*. 2015;126(26):2899-2901.
14. Stoddart A, Qian Z, Fernald AA, et al. Retroviral insertional mutagenesis identifies the del(5q) genes, CXXC5, TIFAB and ETF1, as well as the Wnt pathway, as potential targets in del(5q) myeloid neoplasms. *Haematologica*. 2016.
15. Treppendahl MB, Mollgard L, Hellstrom-Lindberg E, Cloos P, Gronbaek K. Downregulation but lack of promoter hypermethylation or somatic mutations of the potential tumor suppressor CXXC5 in MDS and AML with deletion 5q. *Eur J Haematol*. 2013;90(3):259-260.
16. Astori A, Fredly H, Aloysius TA, et al. CXXC5 (retinoid-inducible nuclear factor, RINF) is a potential therapeutic target in high-risk human acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2013;4(9):1438-1448.
17. Bruserud O, Reikvam H, Fredly H, et al. Expression of the potential therapeutic target CXXC5 in primary acute myeloid leukemia cells - high expression is associated with adverse prognosis as well as altered intracellular signaling and transcriptional regulation. *Oncotarget*. 2015;6(5):2794-2811.
18. Knappskog S, Myklebust LM, Busch C, et al. RINF (CXXC5) is overexpressed in solid tumors and is an unfavorable prognostic factor in breast cancer. *Ann Oncol*. 2011;22(10):2208-2215.
19. Benedetti I, De Marzo AM, Geliebter J, Reyes N. CXXC5 expression in prostate cancer: implications for cancer progression. *Int J Exp Pathol*. 2017;98(4):234-243.

20. Devaney JM, Wang S, Funda S, et al. Identification of novel DNA-methylated genes that correlate with human prostate cancer and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2013;16(4):292-300.
21. Kim HY, Yoon JY, Yun JH, et al. CXXC5 is a negative-feedback regulator of the Wnt/beta-catenin pathway involved in osteoblast differentiation. *Cell Death Differ.* 2015;22(6):912-920.
22. Zhang M, Wang R, Wang Y, et al. The CXXC finger 5 protein is required for DNA damage-induced p53 activation. *Sci China C Life Sci.* 2009;52(6):528-538.
23. Spruijt CG, Gnerlich F, Smits AH, et al. Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell.* 2013;152(5):1146-1159.
24. Frauer C, Rottach A, Meilinger D, et al. Different binding properties and function of CXXC zinc finger domains in Dnmt1 and Tet1. *PLoS One.* 2011;6(2):e16627.
25. Ko M, An J, Bandukwala HS, et al. Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. *Nature.* 2013;497(7447):122-126.
26. Ma S, Wan X, Deng Z, et al. Epigenetic regulator CXXC5 recruits DNA demethylase Tet2 to regulate TLR7/9-elicited IFN response in pDCs. *J Exp Med.* 2017;214(5):1471-1491.
27. Aras S, Pak O, Sommer N, et al. Oxygen-dependent expression of cytochrome c oxidase subunit 4-2 gene expression is mediated by transcription factors RBPJ, CXXC5 and CHCHD2. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(4):2255-2266.
28. Marshall PA, Hernandez Z, Kaneko I, et al. Discovery of novel vitamin D receptor interacting proteins that modulate 1,25-dihydroxyvitamin D3 signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2012;132(1-2):147-159.
29. Wang X, Liao P, Fan X, et al. CXXC5 Associates with Smads to Mediate TNF-alpha Induced Apoptosis. *Curr Mol Med.* 2013;13(8):1385-1396.
30. Pardali K, Moustakas A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1775(1):21-62.
31. Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(11):807-821.
32. Blank U, Karlsson S. TGF-beta signaling in the control of hematopoietic stem cells. *Blood.* 2015;125(23):3542-3550.
33. Krystal G, Lam V, Dragowska W, et al. Transforming growth factor beta 1 is an inducer of erythroid differentiation. *J Exp Med.* 1994;180(3):851-860.
34. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 2003;425(6958):577-584.
35. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003;113(6):685-700.
36. Bhagat TD, Zhou L, Sokol L, et al. miR-21 mediates hematopoietic suppression in MDS by activating TGF-beta signaling. *Blood.* 2013;121(15):2875-2881.
37. Zhou L, McMahon C, Bhagat T, et al. Reduced SMAD7 leads to overactivation of TGF-beta signaling in MDS that can be reversed by a specific inhibitor of TGF-beta receptor I kinase. *Cancer Res.* 2011;71(3):955-963.
38. Gautier EF, Ducamp S, Leduc M, et al. Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis. *Cell Rep.* 2016;16(5):1470-1484.
39. Millot GA, Vainchenker W, Dumenil D, Svinarchuk F. Differential signalling of NH2-terminal flag-labelled thrombopoietin receptor activated by TPO or anti-FLAG antibodies. *Cell Signal.* 2004;16(3):355-363.
40. Amsellem S, Ravet E, Fichelson S, Pflumio F, Dubart-Kupperschmitt A. Maximal lentivirus-mediated gene transfer and sustained transgene expression in human hematopoietic primitive cells and their progeny. *Mol Ther.* 2002;6(5):673-677.
41. Papageorgis P, Lambert AW, Ozturk S, et al. Smad signaling is required to maintain epigenetic silencing during breast cancer progression. *Cancer Res.* 2010;70(3):968-978.

42. Lecoq-Lafon C, Verdier F, Fichelson S, et al. Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of GAB1 and its association with SHC, SHP2, SHIP, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Blood*. 1999;93(8):2578-2585.
43. Freyssonier JM, Lecoq-Lafon C, Amsellem S, et al. Purification, amplification and characterization of a population of human erythroid progenitors. *Br J Haematol*. 1999;106(4):912-922.
44. Merryweather-Clarke AT, Atzberger A, Soneji S, et al. Global gene expression analysis of human erythroid progenitors. *Blood*. 2011;117(13):e96-108.
45. An X, Schulz VP, Li J, et al. Global transcriptome analyses of human and murine terminal erythroid differentiation. *Blood*. 2014;123(22):3466-3477.
46. Keller MA, Addya S, Vadigepalli R, et al. Transcriptional regulatory network analysis of developing human erythroid progenitors reveals patterns of coregulation and potential transcriptional regulators. *Physiol Genomics*. 2006;28(1):114-128.
47. Akel S, Bertolette D, Petrow-Sadowski C, Ruscetti FW. Levels of Smad7 regulate Smad and mitogen activated kinases (MAPKs) signaling and controls erythroid and megakaryocytic differentiation of erythroleukemia cells. *Platelets*. 2007;18(8):566-578.
48. Pellagatti A, Cazzola M, Giagounidis AA, et al. Gene expression profiles of CD34+ cells in myelodysplastic syndromes: involvement of interferon-stimulated genes and correlation to FAB subtype and karyotype. *Blood*. 2006;108(1):337-345.
49. Akel S, Petrow-Sadowski C, Laughlin MJ, Ruscetti FW. Neutralization of autocrine transforming growth factor-beta in human cord blood CD34(+)/CD38(-)/Lin(-) cells promotes stem-cell-factor-mediated erythropoietin-independent early erythroid progenitor development and reduces terminal differentiation. *Stem Cells*. 2003;21(5):557-567.
50. Gao X, Lee HY, da Rocha EL, et al. TGF-beta inhibitors stimulate red blood cell production by enhancing self-renewal of BFU-E erythroid progenitors. *Blood*. 2016;128(23):2637-2641.
51. Pina C, Teles J, Fugazza C, et al. Single-Cell Network Analysis Identifies DDIT3 as a Nodal Lineage Regulator in Hematopoiesis. *Cell Rep*. 2015;11(10):1503-1510.
52. Madzo J, Liu H, Rodriguez A, et al. Hydroxymethylation at gene regulatory regions directs stem/early progenitor cell commitment during erythropoiesis. *Cell Rep*. 2014;6(1):231-244.
53. Yan H, Wang Y, Qu X, et al. Distinct roles for TET family proteins in regulating human erythropoiesis. *Blood*. 2017;129(14):2002-2012.
54. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009;145(6):788-800.
55. Hahn CN, Chong CE, Carmichael CL, et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2011;43(10):1012-1017.
56. Ruscetti FW, Akel S, Bartelmez SH. Autocrine transforming growth factor-beta regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context. *Oncogene*. 2005;24(37):5751-5763.
57. Yan X, Wu J, Jiang Q, Cheng H, Han JJ, Chen YG. CXXC5 suppresses hepatocellular carcinoma by promoting TGF-beta-induced cell cycle arrest and apoptosis. *J Mol Cell Biol*. 2017.
58. Lee SH, Seo SH, Lee DH, Pi LQ, Lee WS, Choi KY. Targeting of CXXC5 by a Competing Peptide Stimulates Hair Re-growth and Wound-Induced Hair Neogenesis. *J Invest Dermatol*. 2017.
59. Manz MG, Miyamoto T, Akashi K, Weissman IL. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(18):11872-11877.

Figure Legends

Figure 1. *RINF* expression is downregulated during erythroid maturation of human hematopoietic progenitors cultured *in vitro*. (A) Schematic representation of cell culture experiments. CD34⁺ cells (from human cord blood or adult bone marrow) were first amplified during 7 days (D-7 to D0, in black) in presence of SCF, IL3 and IL6 (see Methods). At day 7 of cell expansion, CD36⁺ cells were sorted and EPO was added to the medium in order to trigger the late-stage of erythropoiesis, a phase lasting 8 to 12 days (in red). (B) For morphological characterization, cells were cytospun and stained with May-Grünwald-Giemsa method (MGG) and the repartition of cells among differentiation stages indicated in percentage (right panel): early progenitor (Prog), proerythroblast (ProE), early and late basophilic erythroblast (Baso), polychromatophilic erythroblast (Poly), orthochromatic erythroblast (Ortho), and Reticulocyte (Retic). Scale bar represents 20 μ m. The experiment presented here is representative of four distinct experiments which were performed on cells isolated from human cord blood. *RINF* protein was detected by western-blot analysis (lower panel). HSC70 protein was used as a loading control. For each lane, 40 μ g of protein was loaded. (C) *CXXC5* mRNA expression was measured by quantitative RT-PCR. *CXXC5* mRNA expression is down-regulated from the basophilic erythroblast stage. Here, CD34⁺ cells were isolated from adult human bone marrow, but a similar expression profile was observed with cells isolated from cord blood.

Figure 2. *RINF* knockdown accelerates erythroid maturation of human hematopoietic progenitors cultured *in vitro*. (A) Schematic representation of shRNA-mediated *RINF* loss-of-function experiment. CD34⁺ cells (isolated either from cord-blood or adult bone marrow) were transduced with the lentiviral vector pTRIPDU3/GFP expressing a shRNA targeting *RINF* mRNA expression (shRNA/*RINF*) or a non-target sequence (shRNA/Control). Specificity and efficiency of shRNA sequences have been previously validated.⁸ CD34⁺ cells were transduced at day 5 of the amplification step. GFP-positive cells were sorted by FACS two days after transduction. At that time, more than 80% of the cells were CD36⁺. Less than 5% of cell death was observed with the two vectors (trypan blue). EPO was added after sorting and maintained during 8 to 12 days. (B) *RINF* knock-down efficiency was estimated at the protein level from 2 days post GFP-sorting (i.e. at day 7 of the amplification step or Day 0 of EPO) by Western-Blot analysis using a polyclonal rabbit

antibody (see Methods) that detects a specific band at 33 kDa in total extracts. For each lane, protein extracted from 3.10^5 cells was loaded. P85 (PIK3R1) was used as loading control. In order to obtain sufficient protein material, CD34+ cells were here amplified from a pool of five cord-blood units (5 donors). **(C)** Cell proliferation was assessed as population doublings. One representative growth curve of three separated experiments is presented. **(D)** Morphological analysis has been performed after May-Grünwald-Giemsa (MGG) staining (right panel). In order to know whether the observed acceleration of maturation was statistically significant, a Fisher's exact test was performed. For this, enumerated erythroid cells (n=454) were segregated into either early (Progenitors, ProE, Baso) or late (Polychro, Acido, Retic) group. P value <0.0001. **(E)** Hemoglobin production of the cells was estimated by benzidine assay. The black arrow at day 6 indicates the kinetic points selected for the picture on the right panel. **(F)** Erythroid maturation was also monitored by flow cytometry by using anti-CD71 and anti-glycophorin-A (GPA/CD235a) labelled antibodies. Kinetic curves (*left panels*) represent the percentage of positive cells for both GPA and CD71 antigens in the whole cell suspension for one representative experiment. In the right upper panel, the gray arrow points to more mature cells (CD71 lowered) in the shRNA-RINF condition at day 6. In the right lower panel (at day 10), we can notice a more mature (GPA high) population in shRNA-RINF condition. The green and red arrows (left panel) indicate the kinetic points selected for scattergrams presented on right panels. Altogether, the acceleration of erythroid differentiation was observed in six separate experiments performed with CD34+ cells isolated either from cord-blood (n=3) or adult bone marrow (n=3).

Figure 3. *RINF* loss-of-expression in human HSPC increases the number of erythroid colonies (small BFU-E-derived colonies). Human CD34+ cells isolated from adult bone marrow (BM) or cord blood (CB) were transduced with a lentiviral vector (pTRIPDU3/GFP). After two days in culture (in an amplification medium containing IL3, IL6 and SCF), GFP-expressing cells were sorted by flow cytometry and five hundred cells per well were seeded into methycellulose containing cytokines (IL3, SCF, G-CSF, GM-CSF, and EPO) enabling the formation of erythroid colonies (BFU-E, large and small), myeloid colonies (CFU-G, CFU-M, or CFU-GM), or mixed colonies (CFU-GEMM). Colony Forming Cells (CFC) were counted between 11 and 14 days of culture. To assess the effect of shRNA-mediated *RINF* silencing, a paired comparison

was performed by using a Fisher's exact test *: $p < 0.05$; **: $p < 0.005$; ***: $p < 0.0001$; ns: $p > 0.05$ (A) CD34+ cells were isolated from bone marrow of healthy donors (n=4). The histogram represents the total number of colonies enumerated (left panel) and the relative proportion of each type of colony (right panel). For each of the four donors, the proportions are also visualized by pairs of red dots. (B) The histogram represents the mean number of (small and large) BFU-E-derived colonies (means from four independent experiments). The error bars indicate donor-to-donor variability for each vector (\pm SD). (C) CD34+ cells were isolated from human cord blood units (n=6). The histogram represents means of BFU-E-derived colonies (small and large). The error bars indicate donor-to-donor variability for each vector (\pm SEM). (D) The gating strategy for FACS-sorting of human MEP (Megakaryocyte–Erythroid Progenitor) cells is shown on Figure S3E. We have verified that these MEP cells can only generate erythroid colonies (BFU-E) in our experimental condition. Histogram represents the number of BFU-E-derived colonies enumerated from 1000 MEP-enriched seeded cells (right panel). Data shown are means \pm SD (n=3). The increased number of BFU-Es enumerated in the shRNA-RINF condition was statistically significant (Fisher' exact test ***: $p < 0.0001$). (E) CD34+ were isolated from bone marrow of healthy donors (n=4). Histograms give the mean number of small and large BFU-E-derived colonies. The error bars indicate donor-to-donor variability for each vector (\pm SEM).

Figure 4. *RINF* knockdown accelerates hemin and EPO-induced hemoglobinization of human hematopoietic cell lines K562 and UT7_{5.3}. The pTRIPDU3 lentiviral system was used to constitutively express a shRNA targeting *RINF* expression in K562 (upper panels) and UT7_{5.3} (lower panels) cell line. Two days after transduction, cells were sorted for GFP expression. Cells were then respectively treated for the indicated time with hemin (40 μ M) for K562, or EPO (5UI/ml) for UT7_{5.3}. (A) The relative expression of RINF was measured by Western-Blot analysis using a polyclonal rabbit antibody (see Methods) that detects a specific band at 33 kDa in total extracts. ACTIN (ACTB) was used as a loading control. (B) For hemoglobin production analysis, the benzidine test was used. The percentage of benzidine positive cells was established by counting at least 300 cells per sample. Pictures represent one of three independent experiments.

Figure 5. Ectopic overexpression of *RINF* delays hemoglobinization of human hematopoietic cell lines K562 and UT7_{5.3} triggered by hemin and EPO, respectively. The MigR1 retroviral system (schematized in upper panel A) was used to constitutively express *RINF* in two cell lines. A few days after transduction, cells were sorted for GFP expression. Cells were then respectively treated with hemin (40µM) for K562 or EPO (5UI/ml) for UT7_{5.3}. **(A)** The relative expression of *RINF* was measured by Western-Blot analysis using a polyclonal rabbit antibody (see Methods) that detects a specific band at 33 kDa in total extracts. ACTIN (*ACTB*) was used as a loading control. **(B)** For hemoglobin production analysis, the benzidine test was used. Percentage of benzidine positive cells was established by counting about 300 cells per sample. Pictures represent one of three independent experiments.

Figure 6. *SMAD7* overexpression abolishes the acceleration of hemoglobinization induced by *RINF*-knockdown in K562 cells and *RINF* protein binds to *SMAD7* promoter and upregulates its expression in a transcriptional manner. **(A)** Schematic representation of the pBABE retroviral vector used for *SMAD7* overexpression or empty cassette control. **(B)** Relative expression of *RINF* and *SMAD7* was measured by Western-Blot analysis after retroviral transduction of K562 cells with pBABE/*SMAD7* or pBABE/Empty and puromycin selection (at 1µg/mL) during five days. HSC70 was used as a loading control. **(C)** K562/*SMAD7* and K562/Empty cells were then transduced with pTRIPDU3 lentiviral vector (as described in Figure 4). Cells were sorted for GFP expression two days after transduction. For hemoglobin production analysis, the benzidine test was used. Percentage of benzidine positive cells was established by counting about 300 cells per sample. Pictures represent one of three independent experiments. For statistical analysis a student test was performed for qPCR experiments, and a Fisher's exact test was performed for hemoglobin production analysis (***: $p < 0.0001$; ns: $p > 0.05$). **(D)** The MigR1 retroviral system was used to constitutively express *RINF* in K562 cell line. A few days after transduction, cells were sorted for GFP expression and relative expression of *RINF* and *SMAD7* mRNA levels were measured by quantitative RT-PCR. **(E)** Schematic representation (deduced from ENCODE database) of *SMAD7* gene structure. CpG islands and primer set regions (R0 to R6) used for ChIP-experiments are also indicated as well as the distance to transcription start site (TSS) of *SMAD7* **(F)** ChIP-qPCR bars indicate the percentage of *SMAD7* promoter co-immunoprecipitated by anti-*RINF* (left

panel) or anti-H3K4me3 (right panel) antibody in K562 cell line. (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ns: $p > 0.05$)

Figure 7. ShRNA-mediated *RINF* knock-down downregulates *SMAD7* mRNA expression and accelerates erythroid maturation of primary human hematopoietic progenitors in a TGF β -dependent manner. (A) Cord-blood derived CD34⁺ cells were transduced at day 5 of the amplification step, GFP-sorted (2 days post-transduction), and EPO was added for 8 to 12 days, in presence of TGF β inhibitor (SB-431542, at 10 μ M) or vehicle control (DMSO). Histograms (left panels) and scattergrams (right panel) represent FACS analyses of the whole cell suspension for both GPA and CD71 antigens (upper panel) or CD49d and Band3 (lower panel). The data from one representative experiment out of three separate experiments are presented. In order to know whether the observed acceleration of maturation was statistically significant, a Fisher's exact test was performed. $p < 0.0001$. **(B)** Histogram represents *RINF* (left panel) and *SMAD7* (right panel) mRNA expression levels of shRNA-transduced CD34⁺ cells isolated from 3 cord-blood units (3 donors). In these specific experiments, lentiviral transduction was performed after magnetic CD34-sorting (i.e. Day 0 of the amplification step) and cells were GFP-sorted between 2 and 5 days of the amplification step. Data shown are means \pm SD for each donor (qRT-PCR performed in triplicates). To assess whether or not the mRNA level was statistically different between shRNA-*RINF* and shRNA-Scramble samples, a student T test was performed for each donor (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.005$; ***: $p < 0.0001$; ns: $p > 0.05$). Considering the three biological replicates, both *RINF* and *SMAD7* mRNA levels were statistically down-regulated by shRNA-*RINF* (Paired Student T test ***: $p < 0.001$). **(C)** CD34⁺ cells were isolated from adult bone-marrow (n=11). *RINF* and *SMAD7* mRNA levels were measured by q-RT-PCR. In order to assess whether or not the expression of these two genes correlated in donors' samples, a correlation analysis was performed with the Spearman (for non-parametric analysis) correlation coefficient method: rho ($r = 0.773$), 95% confidence interval (0.303 to 0.940), P (two-tailed) = 0.007.

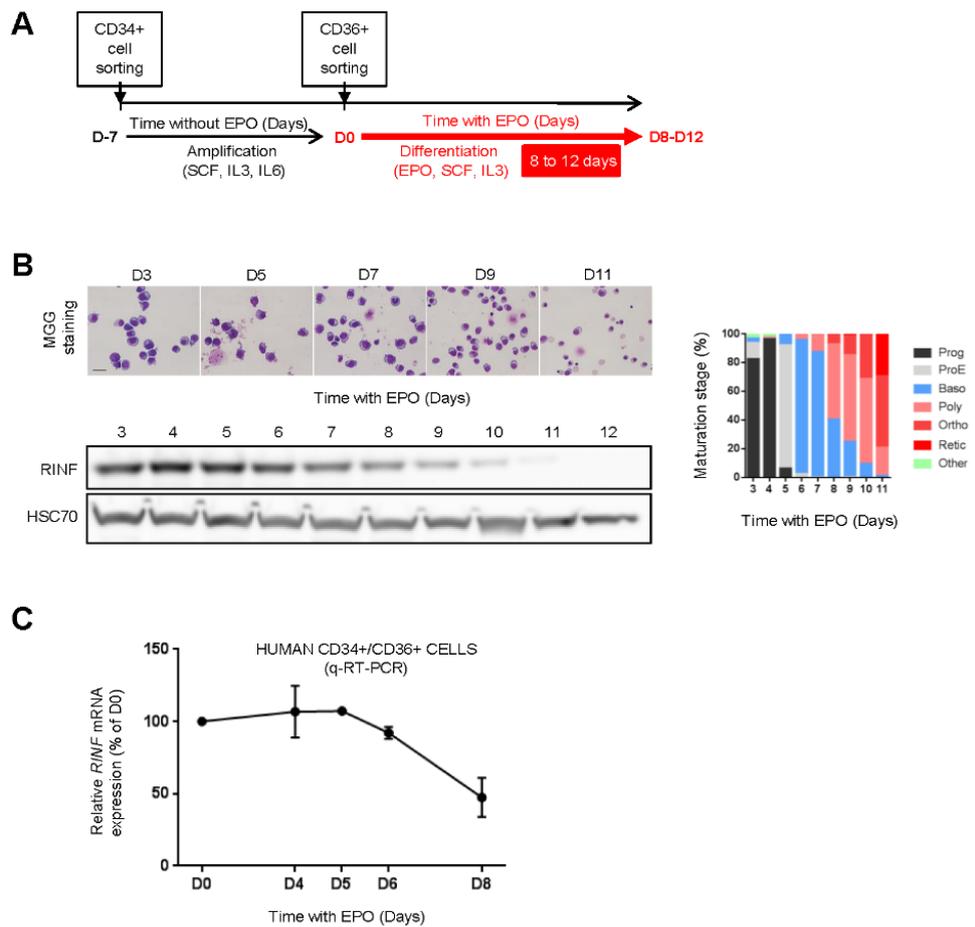


Figure 1
Astori et al.

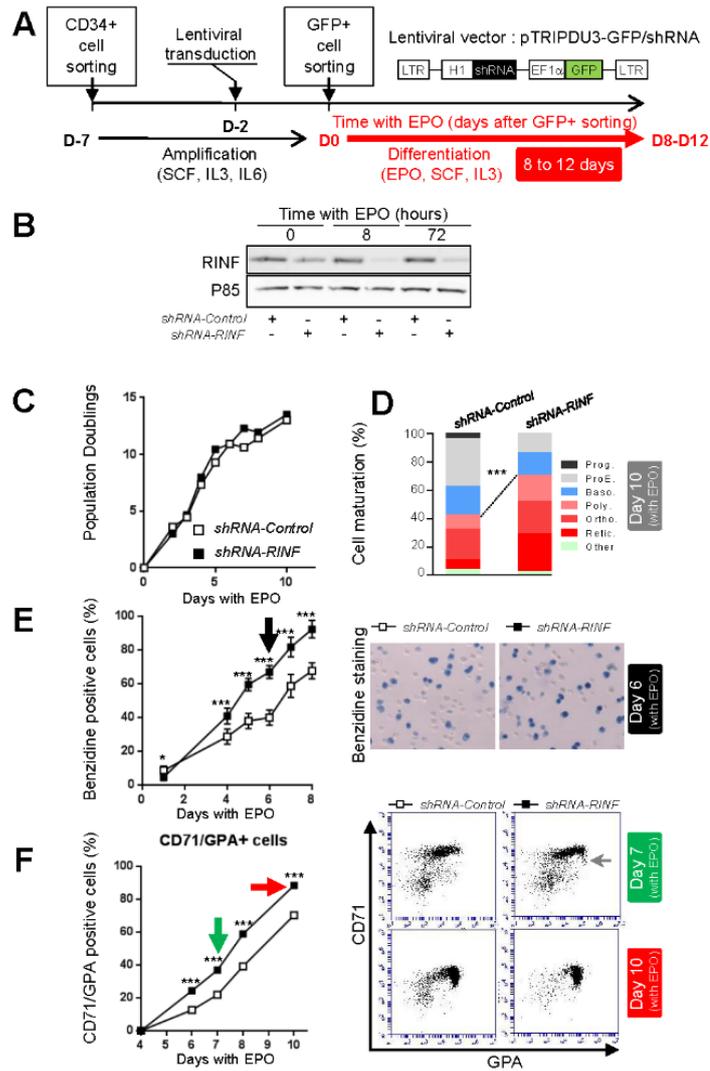


Figure 2
Astori et al.

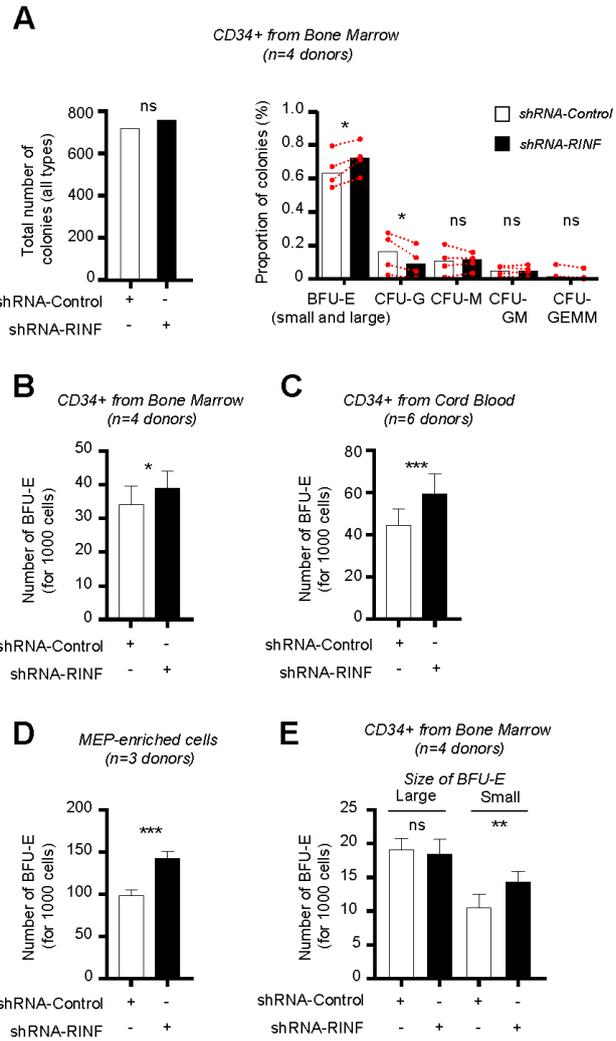


Figure 3
Astori et al.

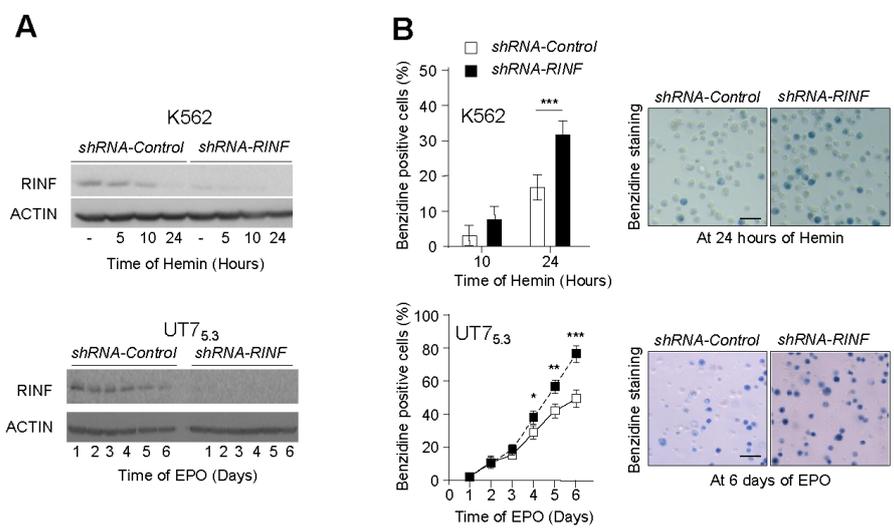


Figure 4
Astori et al.

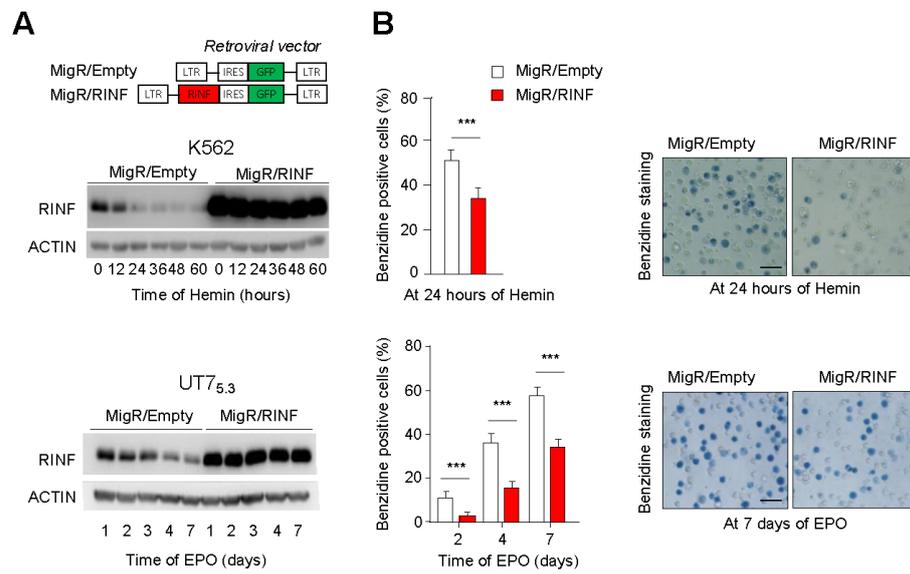


Figure 5
Astori et al.

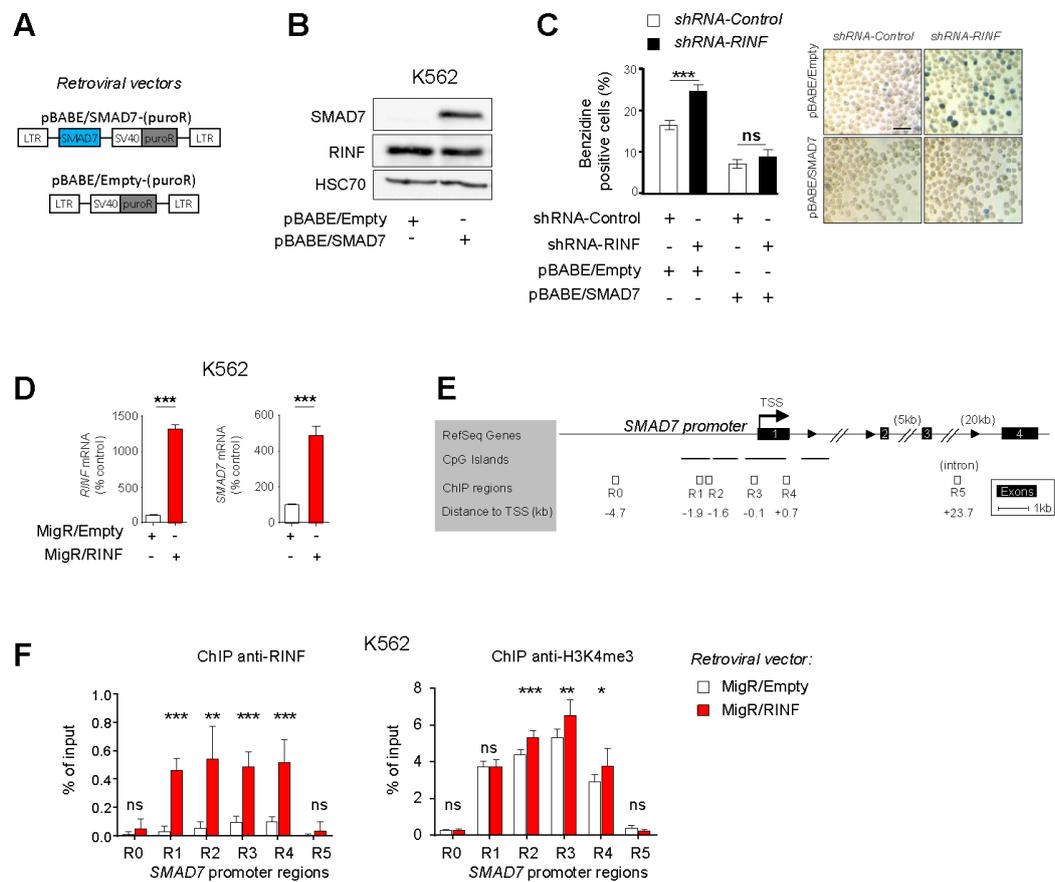


Figure 6
Astori et al.

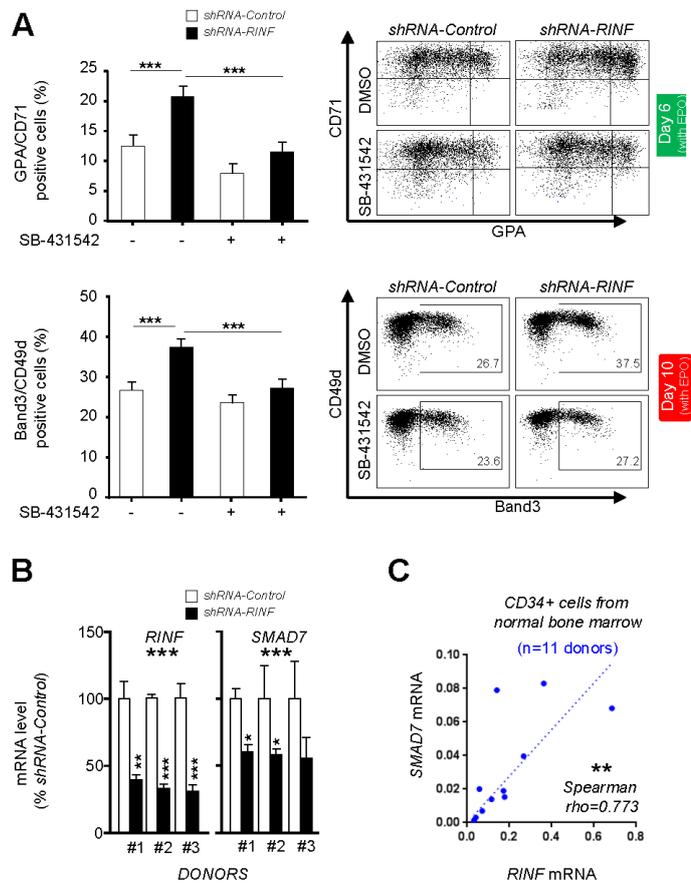


Figure 7
Astori et al.

Figures supplémentaires

Supplemental Methods

Flow cytometric cell sorting of MEP cells

Freshly isolated CD34+ were labeled with the following labeled antibodies directed against the following markers: CD34 APC-Cy7 (clone 581), CD123 APC (6H6) from BioLegend; CD38 PE (clone HIT2) and CD45RA-FITC (HI100) from BD Biosciences, CD10 PE-Cy5 (eBioscience; clone CD-CALLA). Cells were sorted using BD FACSAriaIII (BD Biosciences) according to the gating strategy described by Manz *et al.*⁵⁹ Purification was obtained to at least 98% and only erythroid colonies were generated in CFC assay (i.e. no G-, M-, or GM-derived colony were noticed).

Primer sequences used for quantitative RT-PCR and ChIP-qPCR

Human *PPIA* (Cyclophilin A) endogenous control was obtained from Thermo Fisher Scientific (Cat.N°4333763T). The other primer sequences (5'-3' orientation) used for RT-qPCR and ChIP-qPCR are indicated in the following table.

Q-RT-PCR (Hydrolysis)	Forward	Reverse	Probe sequence (5'-3')
<i>RINF</i>	TCCGCTGCTCTGGAGAAG	CACACGAGCAGTGACATTGC	FAM- aaccctaaagctgccctccc-BBQ
<i>RPLP2</i>	GACCGGCTCAACAAGTTAT	CCCCACCAAGCAGGTACAC	Cy5-agctgaatggaaaaaacattgaagacgtc-BBQ
Q-RT-PCR (SybrGreen)	Forward	Reverse	
<i>cKIT</i>	TATGCTCTCGCACCTTTCCA	TCTCAATGAAGTGCCCTGA	
<i>PU1</i>	CACCTGGAGGTGTCTGACGG	GCCGATCTTCTTGTCTGC	
<i>SMAD7</i>	CAATGACCACGAGTTATGCA	GTTGAAGATGACCTCTAGCCA	
ChIP-qPCR (SybrGreen)	Forward	Reverse	Distance to SMAD7 TSS
<i>SMAD7 R0 (neg.)</i>	ATGGGTGTTTCAAGAGTGGAG	GAAGAGGAAAGCCGTGTAGAG	-4.7kb
<i>SMAD7 R1</i>	CTAGCGCTTCATTATTGGTTT	TCGGTCCAGTCCGGTATAA	-1962-1840
<i>SMAD7 R2</i>	GCAAAACAACAGATCGGGTTTC	CAATCCATTCTGGGAGCTTCT	-1695 -1556
<i>SMAD7 R3</i>	GCCTCGGCTTCTACATGGA	CTCCCCACCCCAATTAAG	-243 -122
<i>SMAD7 R4</i>	CACAGCCTCTTGACTTCGGAG	TCGTCTACTCGCTCCCCCT	+737 +819
<i>SMAD7-R5 (neg.)</i>	CATCCATCTATTCTCACGCC	AGACAGCCCTTAAAGTTAGC	+23.7kb

Table S1. List of genes (n=193) commonly downregulated by *RINF* knockdown in K562 and UT7 cells.

ID	Symbol	Entrez Gene Name	Location	Type(s)
AATK	AATK	apoptosis associated tyrosine kinase	Cytoplasm	kinase
EMR3	ADGRE3	adhesion G protein-coupled receptor E3	Plasma Membrane	G-protein cou
ADM5	ADM5	adrenomedullin 5 (putative)	Other	other
ADRA2C	ADRA2C	adrenoceptor alpha 2C	Plasma Membrane	G-protein cou
AGAP4	AGAP6 (includes ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 5		Other	other
AKAP7	AKAP7	A-kinase anchoring protein 7	Plasma Membrane	other
ANXA2R	ANXA2R	annexin A2 receptor	Plasma Membrane	other
B3GNT4	B3GNT4	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 4	Plasma Membrane	enzyme
BEND5	BEND5	BEN domain containing 5	Cytoplasm	other
C15orf59	C15orf59	chromosome 15 open reading frame 59	Other	other
C1QB	C1QB	complement C1q B chain	Extracellular Space	peptidase
C2orf66	C2orf66	chromosome 2 open reading frame 66	Other	other
C3orf80	C3orf80	chromosome 3 open reading frame 80	Other	other
C8orf74	C8orf74	chromosome 8 open reading frame 74	Other	other
C9orf131	C9orf131	chromosome 9 open reading frame 131	Other	other
CACNG5	CACNG5	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit gamma 5	Plasma Membrane	ion channel
CALML5	CALML5	calmodulin like 5	Cytoplasm	other
CARS	CARS	cysteinyI-HRNA synthetase	Cytoplasm	enzyme
CCDC144NL	CCDC144NL	coiled-coil domain containing 144 family, N-terminal like	Other	other
CDH4	CDH4	cadherin 4	Plasma Membrane	other
CGB8	CGB3 (includes chorionic gonadotropin beta subunit 3		Extracellular Space	other
CHADL	CHADL	chondroadherin like	Extracellular Space	other
CNTN4	CNTN4	contactin 4	Plasma Membrane	enzyme
COL18A1	COL18A1	collagen type XVIII alpha 1 chain	Extracellular Space	other
COL4A2	COL4A2	collagen type IV alpha 2	Extracellular Space	other
COL6A1	COL6A1	collagen type VI alpha 1	Extracellular Space	other
COX6B2	COX6B2	cytochrome c oxidase subunit 6B2	Cytoplasm	enzyme
CPOX	CPOX	coproporphyrinogen oxidase	Cytoplasm	enzyme
CRHR1	CRHR1	corticotropin releasing hormone receptor 1	Plasma Membrane	G-protein cou
CRP	CRP	C-reactive protein, pentraxin-related	Extracellular Space	other
CSDC2	CSDC2	cold shock domain containing C2	Cytoplasm	other
CXXC5	CXXC5	CXXC finger protein 5	Nucleus	other
CYP4F30P	CYP4F30P	cytochrome P450 family 4 subfamily F member 30, pseudogene	Other	other
DAZZ	DAZZ	deleted in azoospermia 2	Cytoplasm	translation reg
DLGAP3	DLGAP3	DLG associated protein 3	Cytoplasm	other
DNAJC5G	DNAJC5G	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C5 gamma	Other	other
DND1	DND1	DND microRNA-mediated repression inhibitor 1	Cytoplasm	other
DRGX	DRGX	dorsal root ganglia homeobox	Nucleus	other
DUSP4	DUSP4	dual specificity phosphatase 4	Nucleus	phosphatase
EPN2-IT1	EPN2-IT1	EPN2 intronic transcript 1	Other	other
FAM153C	FAM153C	family with sequence similarity 153, member C	Other	other
FAM229A	FAM229A	family with sequence similarity 229 member A	Other	other
FAM26D	FAM26D	family with sequence similarity 26 member D	Other	other
FGD5P1	FGD5P1	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 5 pseudogene 1	Other	other
GATA3	GATA3	GATA binding protein 3	Nucleus	transcription r
GJC1	GJC1	gap junction protein gamma 1	Plasma Membrane	ion channel
GPIHBP1	GPIHBP1	glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1	Plasma Membrane	transporter
GPR139	GPR139	G protein-coupled receptor 139	Plasma Membrane	G-protein cou
GPR55	GPR55	G protein-coupled receptor 55	Plasma Membrane	G-protein cou
GPRIN2	GPRIN2	G protein regulated inducer of neurite outgrowth 2	Other	other
GRASPOS	GRASPOS	GRP1-associated scaffold protein opposite strand	Other	other
GSX2	GSX2	GS homeobox 2	Nucleus	transcription r
HAR1B	HAR1B	highly accelerated region 1B (non-protein coding)	Other	other
HCAR2	HCAR2	hydroxycarboxylic acid receptor 2	Plasma Membrane	G-protein cou
HCG27	HCG27	HLA complex group 27 (non-protein coding)	Other	other
HHIPL1	HHIPL1	HHIP like 1	Other	other
HNRNPKP3	HNRNPKP3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K pseudogene 3	Other	other
HOXB5	HOXB5	homeobox B5	Nucleus	transcription r
HOXC9	HOXC9	homeobox C9	Nucleus	transcription r
HSPA6	HSPA6	heat shock protein family A (Hsp70) member 6	Nucleus	enzyme
IGFL1	IGFL1	IGF like family member 1	Extracellular Space	other
IL23A	IL23A	interleukin 23 subunit alpha	Extracellular Space	cytokine
IL36A	IL36A	interleukin 36, alpha	Extracellular Space	cytokine
IRF2BP1	IRF2BP1	interferon regulatory factor 2 binding protein 1	Nucleus	transcription r
IRS4	IRS4	insulin receptor substrate 4	Plasma Membrane	other
KCNA1	KCNA1	potassium voltage-gated channel subfamily A member 1	Plasma Membrane	ion channel
KCNC1	KCNC1	potassium voltage-gated channel subfamily C member 1	Plasma Membrane	ion channel
KCNK17	KCNK17	potassium two pore domain channel subfamily K member 17	Plasma Membrane	ion channel
KRTAP2-1	KRTAP2-1	keratin associated protein 2-1	Other	other
KRTAP6-3	KRTAP6-3	keratin associated protein 6-3	Other	other
KRTAP9-8	KRTAP9-8	keratin associated protein 9-8	Other	other
LCE2A	LCE2A	late cornified envelope 2A	Other	other
LCE2C	LCE2C/LCE2D	late cornified envelope 2D	Other	other
LEMD1	LEMD1	LEM domain containing 1	Other	other

LIN28A	LIN28A	lin-28 homolog A	Cytoplasm	other
LINC00641	LINC00641	long intergenic non-protein coding RNA 641	Other	other
LINC00927	LINC00927	long intergenic non-protein coding RNA 927	Other	other
LINC00968	LINC00968	long intergenic non-protein coding RNA 968	Other	other
LINC00987	LINC00987	long intergenic non-protein coding RNA 987	Other	other
LINC00996	LINC00996	long intergenic non-protein coding RNA 996	Other	other
LINC01010	LINC01010	long intergenic non-protein coding RNA 1010	Other	other
LMOD3	LMOD3	leiomodlin 3	Other	other
LRRC32	LRRC32	leucine rich repeat containing 32	Plasma Membrane	other
LRRC4B	LRRC4B	leucine rich repeat containing 4B	Plasma Membrane	other
LRRC52	LRRC52	leucine rich repeat containing 52	Other	other
MACROD2	MACROD2	MACRO domain containing 2	Nucleus	enzyme
MAFG-AS1	MAFG-AS1	MAFG antisense RNA 1 (head to head)	Other	other
MAP4K1	MAP4K1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1	Cytoplasm	kinase
MIR103A1	mir-103	microRNA 107	Cytoplasm	microRNA
MIR1257	mir-1257	microRNA 1257	Cytoplasm	microRNA
MIR1288	mir-1288	microRNA 1288	Cytoplasm	microRNA
MIR129-2	mir-129	microRNA 129-2	Cytoplasm	microRNA
MIR1301	mir-1301	microRNA 1301	Cytoplasm	microRNA
MIR152	mir-148	microRNA 148a	Cytoplasm	microRNA
MIR149	mir-149	microRNA 149	Cytoplasm	microRNA
MIR377	mir-154	microRNA 494	Other	microRNA
MIR1972-1	mir-1972	microRNA 1972-1	Cytoplasm	microRNA
MIR211	mir-204	microRNA 204	Cytoplasm	microRNA
MIR29C	mir-29	microRNA 29a	Cytoplasm	microRNA
MIR371A	mir-290	microRNA 372	Other	microRNA
MIR3065	mir-3065	microRNA 3065	Cytoplasm	microRNA
MIR320B2	mir-320	microRNA 320a	Cytoplasm	microRNA
MIR3689C	mir-3689	microRNA 3689b	Cytoplasm	microRNA
MIR4654	mir-4654	microRNA 4654	Cytoplasm	microRNA
MIR4803	mir-4803	microRNA 4803	Cytoplasm	microRNA
MIR489	mir-489	microRNA 489	Cytoplasm	microRNA
MIR550A1	mir-550	microRNA 550a-1	Cytoplasm	microRNA
MIR569	mir-569	microRNA 569	Cytoplasm	microRNA
MIR581	mir-581	microRNA 581	Cytoplasm	microRNA
MIR615	mir-615	microRNA 615	Cytoplasm	microRNA
MIR647	mir-647	microRNA 647	Cytoplasm	microRNA
MIR200A	mir-8	microRNA 200c	Cytoplasm	microRNA
MIR4291	MIR4291	microRNA 4291	Cytoplasm	microRNA
MIR4440	MIR4440	microRNA 4440	Cytoplasm	microRNA
MIR4692	MIR4692	microRNA 4692	Cytoplasm	microRNA
MRGPRG	MRGPRG	MAS related GPR family member G	Plasma Membrane	G-protein cou
MUC6	MUC6	mucin 6, oligomeric mucus/gel-forming	Extracellular Space	other
MYADML	MYADML	myeloid associated differentiation marker like (pseudogene)	Other	other
NEURL2	NEURL2	neurallized E3 ubiquitin protein ligase 2	Cytoplasm	other
NGB	NGB	neuroglobin	Cytoplasm	transporter
NHSL2	NHSL2	NHS like 2	Other	other
NKX6-3	NKX6-3	NK6 homeobox 3	Other	other
NOXA1	NOXA1	NADPH oxidase activator 1	Other	other
NPIP7	NPIP7	nuclear pore complex interacting protein family member B7	Other	other
NRGN	NRGN	neurogranin	Other	other
NRTN	NRTN	neurturin	Extracellular Space	growth factor
NUDT16L1	NUDT16L1	nudix hydrolase 16 like 1	Cytoplasm	other
OGFR	OGFR	opioid growth factor receptor	Plasma Membrane	other
OLFML3	OLFML3	olfactomedin like 3	Extracellular Space	other
OMD	OMD	osteonodulin	Extracellular Space	other
OR2A25	OR2A25	olfactory receptor family 2 subfamily A member 25	Plasma Membrane	G-protein cou
OR2Y1	OR2Y1	olfactory receptor family 2 subfamily Y member 1	Plasma Membrane	G-protein cou
OR5C1	OR5C1	olfactory receptor family 5 subfamily C member 1	Plasma Membrane	G-protein cou
OR5R1	OR5R1	olfactory receptor family 5 subfamily R member 1 (gene/pseudogene)	Plasma Membrane	G-protein cou
ORX2	ORX2	3-oxoacid CoA-transferase 2	Cytoplasm	other
P2RY13	P2RY13	purinergic receptor P2Y13	Plasma Membrane	G-protein cou
PARVG	PARVG	parvin gamma	Cytoplasm	other
PAX7	PAX7	paired box 7	Nucleus	transcription r
PCDHA1	PCDHA1	protocadherin alpha 1	Plasma Membrane	other
PF4V1	PF4V1	platelet factor 4 variant 1	Extracellular Space	cytokine
PHF13	PHF13	PHD finger protein 13	Nucleus	other
POTEKP	POTEKP	POTE ankyrin domain family member K, pseudogene	Cytoplasm	other
POU5F1P3	POU5F1P3	POU class 5 homeobox 1 pseudogene 3	Other	other
PRR21	PRR21	proline rich 21	Other	other
PRRT3-AS1	PRRT3-AS1	PRRT3 antisense RNA 1	Other	other
PRSS41	PRSS41	protease, serine 41	Plasma Membrane	peptidase
PTPRF	PTPRF	protein tyrosine phosphatase, receptor type F	Plasma Membrane	phosphatase
PWRN1	PWRN1	Prader-Willi region non-protein coding RNA 1	Other	other
RAMP2-AS1	RAMP2-AS1	RAMP2 antisense RNA 1	Other	other
RARRES2	RARRES2	retinoic acid receptor responder 2	Plasma Membrane	transmembrai
RBMY1E	RBMY1A1 (includ	RNA binding motif protein, Y-linked, family 1, member A1	Nucleus	other
C15orf60	REC114	REC114 meiotic recombination protein	Other	other
RFPL3	RFPL1/RFPL3	ret finger protein like 3	Other	other
RHBDL2	RHBDL2	rhomboid like 2	Plasma Membrane	peptidase

RPH3AL	RPH3AL	rabphilin 3A-like (without C2 domains)	Plasma Membrane	other
S1PR1	S1PR1	sphingosine-1-phosphate receptor 1	Plasma Membrane	G-protein cou
SCARA3	SCARA3	scavenger receptor class A member 3	Plasma Membrane	transmembra
SCGB3A1	SCGB3A1	secretoglobin family 3A member 1	Extracellular Space	cytokine
SDC1	SDC1	syndecan 1	Plasma Membrane	enzyme
SIAH3	SIAH3	siah E3 ubiquitin protein ligase family member 3	Cytoplasm	other
SIGLEC16	SIGLEC16	sialic acid binding Ig like lectin 16 (gene/pseudogene)	Plasma Membrane	other
SIX3	SIX3	SIX homeobox 3	Nucleus	transcription r
SIX6	SIX6	SIX homeobox 6	Nucleus	transcription r
SLC17A6	SLC17A6	solute carrier family 17 member 6	Plasma Membrane	transporter
SLC52A1	SLC52A1	solute carrier family 52 member 1	Plasma Membrane	other
SMAD7	SMAD7	SMAD family member 7	Nucleus	transcription r
SMIM18	SMIM18	small integral membrane protein 18	Other	other
SMIM22	SMIM22	small integral membrane protein 22	Other	other
SMPD3	SMPD3	sphingomyelin phosphodiesterase 3	Cytoplasm	enzyme
SMTNL1	SMTNL1	smoothenin like 1	Cytoplasm	other
SNX21	SNX21	sorting nexin family member 21	Cytoplasm	transporter
SOWAHD	SOWAHD	so sondowah ankyrin repeat domain family member D	Other	other
SOX2	SOX2	SRY-box 2	Nucleus	transcription r
SPATA21	SPATA21	spermatogenesis associated 21	Other	other
SPRR2D	SPRR2D	small proline rich protein 2D	Cytoplasm	other
SSTR1	SSTR1	somatostatin receptor 1	Plasma Membrane	G-protein cou
SYNGR4	SYNGR4	synaptogyrin 4	Plasma Membrane	other
TAAR5	TAAR5	trace amine associated receptor 5	Plasma Membrane	G-protein cou
TEPP	TEPP	testis, prostate and placenta expressed	Other	other
TFAP2E	TFAP2E	transcription factor AP-2 epsilon	Nucleus	transcription r
TIE1	TIE1	tyrosine kinase with immunoglobulin like and EGF like domains 1	Plasma Membrane	kinase
TMED6	TMED6	transmembrane p24 trafficking protein 6	Cytoplasm	other
TMPRSS4-AS	TMPRSS4-AS1	TMPRSS4 antisense RNA 1	Other	other
TOLLIP-AS1	TOLLIP-AS1	TOLLIP antisense RNA 1 (head to head)	Other	other
TPSD1	TPSD1	tryptase delta 1	Extracellular Space	peptidase
TTC30A	TTC30A	tetratricopeptide repeat domain 30A	Other	other
TUSC1	TUSC1	tumor suppressor candidate 1	Other	other
USP3-AS1	USP3-AS1	USP3 antisense RNA 1	Other	other
WFDC2	WFDC2	WAP four-disulfide core domain 2	Extracellular Space	other
ZDHHC15	ZDHHC15	zinc finger DHHC-type containing 15	Cytoplasm	enzyme
ZMIZ1	ZMIZ1	zinc finger MIZ-type containing 1	Nucleus	other
ZNF423	ZNF423	zinc finger protein 423	Nucleus	transcription r
ZNF836	ZNF836	zinc finger protein 836	Other	other

Table S2. List of Upstream Regulators according to Ingenuity Pathway Analysis (IPA).

© 2008-2016 OIA GEN. All rights reserved.

Upstream Regulator	Molecule Type	p-value of overlap	Target molecules in dataset
SMAD5	transcription regulator	0.00014	COL6A1, CRP, DUSP4, GATA3, IL23A, S1PR1, SMAD7, SOX2
LHX2	transcription regulator	0.00071	RARRS2, SIX3, SIX6
CDM1B	kinase	0.00109	CSDC2, DAZ2, SIX3, SMAD7, SOX2
SDFE1	transcription regulator	0.00118	COL4A2, COL6A1, PTPRF, SDC1
low molecular weight heparin	chemical drug	0.00125	SDC1, TIE1
CR1L	other	0.00131	COL18A1, COL4A2, COL6A1
CCND3-EM1	transcription regulator	0.00201	HOXB5, HOXC9, PAX7
KLF10	transcription regulator	0.00340	GATA3, SMAD7
miR-1181 (miRNAs w/seed CGUCGCC)	mature microRNA	0.00373	COL18A1, NRG1, SOX2, SSTR1
AMG527	biologic drug	0.00384	IL23A, IL23A
miR-607 (miRNAs w/seed UUCAAUU)	mature microRNA	0.00555	AGAP6 (includes others), DUSP4, SCARA3, SOX2, TFAP2E
POU4F1	transcription regulator	0.00674	CACNG5, GATA3, HOXB5, HOXC9
W53-1-gp130	complex	0.00678	GAT A3
FGF3	growth factor	0.00678	SOX2
PPP4C	phosphatase	0.00678	IRS4
ZC3H8	transcription regulator	0.00678	GAT A3
miR-5124-5p (miRNAs w/seed UCGCGGG)	mature microRNA	0.00787	C3orf93, NGB, NRTN, SCGB3A1
miR-127-3p (miRNAs w/seed CGGAUCC)	mature microRNA	0.00849	NRGN, S1PR1, SDC1, SIAH3, SMPD3
DLL1	enzyme	0.00882	GAT A3, HOXB5
miR-4532 (miRNAs w/seed CCCGGGG)	mature microRNA	0.00891	C3orf93, COL18A1, COL6A1, COX6B2, DLGAP3, DUSP4, HOXC9, NIKX3-3, NRTN, RPH3AL, SMPD3, SSTR1, ZMIZ1
ETS2	transcription regulator	0.00903	CGB3 (includes others), SOX2, TIE1
miR-1225-3p (miRNAs w/seed GAGCCCC)	mature microRNA	0.00980	ADRA2C, COL4A2, COL6A1, CSDC2, HCAR2, KCNC1, LRRRC4B, MUC6, NGB, PHF13, SCARA3, SDC1, SIAH3, SSTR1, TFAP2E, ZDHHC15
OTX2	transcription regulator	0.00984	CDH4, SIX3, SOX2
IRSI	enzyme	0.00987	COL4A2, COL6A1, GATA3, PTPRF
miR-1307-3p (miRNAs w/seed CUCGGCG)	mature microRNA	0.01040	AKAP7, FAM229A, LRRRC32, NIKX3-3, NRG1, SOX2
LTPB	other	0.01050	GATA3, SMAD7
WIN (5-(8-difluorophenacetyl-L-Ala)) L-S-phenylalanine	micromolecule	0.01140	PTPRF, SOX2
miR-142	micromolecule	0.01240	LRRRC32, SOX2
PHF1	transcription regulator	0.01340	HOXB5, HOXC9
sirolimus	biologic drug	0.01350	CRP
pasireotide	biologic drug	0.01350	SSTR1
SEW2071	chemical reagent	0.01350	S1PR1
HSD17B14	enzyme	0.01350	IL23A
ND1	other	0.01350	PTPRF
SS18	transcription regulator	0.01350	SOX2
NBR1	other	0.01350	GATA3
TIE4	transcription regulator	0.01350	SIX3
FBXW8	other	0.01350	MAP4K1
ROBO1	transmembrane receptor	0.01350	PAX7
FOXO1	transcription regulator	0.01350	SDC1
cydophosphamide/doxorubicin	chemical drug	0.01350	CRP
SUN2511	chemical reagent	0.01350	LRRRC32
lapatinib/rastuzumab	biologic drug	0.01350	CRP
PAX5	transcription regulator	0.01380	SOX2, LRRRC32, SIX3, SIX6, SOX2
EZH2	transcription regulator	0.01460	GATA3, HOXB5, HOXC9, IL23A, KCNA1, PAX7
PRDM5	transcription regulator	0.01680	C15orf69, CDH4, SOX2
MEK3	enzyme	0.01720	DAZ2, REC114, TIE1
tosedostat	chemical drug	0.01760	CARS, SDC1
miR-4759 (miRNAs w/seed AGGACUA)	mature microRNA	0.01780	CCDC144NL, GPRIN2, LIN28A, RPL1, RPL3, SLC17A6, TFAP2E, TTC30A
SMAD2	transcription regulator	0.01680	S1PR1, SMAD7, SOX2
miR-4459 (and other miRNAs w/seed GGGCG)	mature microRNA	0.01970	CDH4, GPIHBP1, LEMD1, MACROD2, MUC6, OLFML3, RPH3AL, SNAI2, TUSC1
TFH3	complex	0.02000	COL6A1
NBE1	transcription regulator	0.02000	PAX7
SOX21	transcription regulator	0.02000	DUSP4
VDAC1	ion channel	0.02000	NGB
USP21	peptidase	0.02000	GAT A3
emafine	chemical toxicant	0.02000	SLC17A6
miR-3144-5p (miRNAs w/seed GGGGACC)	mature microRNA	0.02080	CALML5, COL4A2, CSDC2, GPIHBP1, JGFL1, JRF2BP1, LRRRC32, NRG1, PTPRF, SMAD7, TEPF, TSPD1, TTC30A, ZDHHC15, ZMIZ1
PRM5	transcription regulator	0.02100	SMAD7, SOX2
cydopamine	chemical reagent	0.02100	SMPD3, SOX2
miR-4731-5p (miRNAs w/seed CGUGGGG)	mature microRNA	0.02190	CDH4, COL18A1, CRP, DUSP4, GPR55, HOXC9, KCNC1, LRRRC4B, MUC6, NGB, NRG1, OXCT2, PAX7, PHF13, PTPRF, RARRS2, RPH3AL, SDC1, SIX3, SMAD7
olastic acid	chemical toxicant	0.02210	IL23A, IL23A, SSTR1
KAT5A	enzyme	0.02240	HOXB5, HOXC9
STAT	group	0.02480	CRP, SMAD7
CEACAM1	transporter	0.02490	COL18A1, TIE1
miR-659 (miRNAs w/seed GCGGAGC)	mature microRNA	0.02620	GPIHBP1, LRRRC4B, NRG1, NUDT16L1, PCDH1, PTPRF, SIX3, ZMIZ1, ZNF423
miR-4472 (and other miRNAs w/seed GUGG)	mature microRNA	0.02660	CDH4, DLGAP3, GPIHBP1, HOXB5, HOXC9, KCNC1, KCNK17, LRRRC4B, NOXA1, PARVG, PAX7, PCDH1, SDC1, SIAH3, SMPD3, TIE1, ZDHHC1
miR-3141 (miRNAs w/seed AGGGCGG)	mature microRNA	0.02660	COL6A1, DLGAP3, HHIPL1, LRRRC32, LRRRC4B, NGB, NRG1, SDC1
DNAH5	other	0.02690	SOX2
LEO1	other	0.02690	SOX2
idelalisib	chemical drug	0.02690	S1PR1
ADAMT51	peptidase	0.02690	TIE1
CASP14	peptidase	0.02690	CGB3 (includes others)
CFH	other	0.02690	CRP
AES	transcription regulator	0.02690	SIX3
SERPIN1	other	0.02690	COL4A2
LAMTOR3	other	0.02690	SOX2
moxifloxacin	chemical drug	0.02690	SMAD7
piroxicam	chemical drug	0.02690	SMPD3
miR-4867-5p (and other miRNAs w/seed CUC)	mature microRNA	0.02840	CRP, GPR55, HOXC9, KCNC1, LC2C2, LC2D2, LIN28A, MACROD2, MUC6, NGB, OXCT2, PAX7, RARRS2, RPH3AL, SCARA3, SDC1, SIX3, SMAD7
miR-423-3p (miRNAs w/seed GCUCGGU)	mature microRNA	0.02950	COL4A2, DUSP4, FAM229A, KCNC1, KRTAP2-1, RPH3AL
TGF1	transcription regulator	0.03010	GAT A3, SOX2
CYFIP1	enzyme	0.03070	COX6B2, DAZ2, SDC1
PAV5	transcription regulator	0.03150	PTPRF, SDC1
miR-3939 (miRNAs w/seed ACGGGCA)	mature microRNA	0.03230	NRTN, RPH3AL, SSTR1
ibandronate	chemical - kinase inhibito	0.03230	CGB3 (includes others), IL23A, KCNC1
DMP1	other	0.03300	C10B, CSDC2
HR	transcription regulator	0.03300	CALML5, COL6A1
INH8	growth factor	0.03310	COL6A1, GUCY1, SMAD7
beta-glucan	chemical drug	0.03350	IL23A
W146	chemical reagent	0.03350	S1PR1
6-formylindolo[3,2-b]carbazole	chemical reagent	0.03350	GAT A3
IgD	complex	0.03350	SDC1
FkBP1A	enzyme	0.03350	SDC1
HIVEP2	transcription regulator	0.03350	GAT A3
CEBPZ	transcription regulator	0.03350	CRP
ELF2	transcription regulator	0.03350	TIE1
pubchem compound 11483544	chemical reagent	0.03350	IL23A
pubchem compound 11368567	chemical reagent	0.03350	IL23A
pyridoxal phosphate-6'-azophenyl-2',4'-disulfo	chemical reagent	0.03350	IL23A
dopidogrel	chemical drug	0.03350	CRP
tazaiclene	chemical drug	0.03350	RARRS2
miR-516-3p (miRNAs w/seed CCGAGCC)	mature microRNA	0.03660	CDH4, COL18A1, GATA3, LRRRC4B, NRG1, SIX6
forskolin	chemical toxicant	0.03650	CGB3 (includes others), COL18A1, CRHR1, IL23A, PTPRF, SIAH3, SLC17A6, SMAD7, SSTR1
miR-4280 (miRNAs w/seed GCCUCC)	mature microRNA	0.03680	COL18A1, COL4A2, CPOX, CRP, CSDC2, DUSP4, HHIPL1, HSP66, KRTAP9-8, MUC6, NRG1, PARVG, PAX7, PHF13, SMPD3, ZNF423
IL25	cytokine	0.03690	GAT A3, IL23A
miR-675-5p (and other miRNAs w/seed GGU)	mature microRNA	0.03740	GPR55, NRG1, RPH3AL, SCARA3, SDC1, SSTR1, ZMIZ1
miR-639 (miRNAs w/seed UCGCUCG)	mature microRNA	0.03920	AATK, NGB, NRG1, SMPD3, ZMIZ1
miR-4781-5p (miRNAs w/seed AGCGGGG)	mature microRNA	0.03990	DUSP4, GSK3, HOXB5, JRF2BP1, NUDT16L1, SIX3, TEPF, ZMIZ1
Cobra Venom Factor	chemical - endogenous n	0.04000	CRP
Smad1/6/8-Smad4	complex	0.04000	SMAD7
TLR2/TLR4	group	0.04000	IL23A
FkBP8	other	0.04000	SDC1
mir-140	micromolecule	0.04000	SOX2
HFX	transporter	0.04000	IL23A
RNF111	enzyme	0.04000	SMAD7
OGN	growth factor	0.04000	CRHR1
DRD5	q-protein coupled recepto	0.04000	IL23A
STX2	transporter	0.04000	SMAD7

SAR-20347	chemical - kinase inhibito	0.04000	IL23A
pyridoxamine	chemical - endogenous m	0.04000	CRP
chloroquine	chemical drug	0.04210	IL23A, S1PR1
miR-3960 (and other miRNAs w/seed GCGG)	mature microRNA	0.04210	C3orf80, HOXB5, LRRCC4B, PCDHA1, SCGB3A1, ZNF423
miR-4751 (miRNAs w/seed GAGGACC)	mature microRNA	0.04330	COL18A1, MACROD2, OIGFR, PAX7, SCARA3, SLAH3, SOX21, TFAP2E, ZDHHC15
tasolimus	chemical drug	0.04340	KCNMA1, PTPRR1, SLC17A6, SMAD7
WISP2	growth factor	0.04370	GATA3, ZNF423
RGS10	other	0.04370	CRP, IL36A
miR-4739-5p (miRNAs w/seed CCAGCGC)	mature microRNA	0.04400	CDH4, COL6A1, CCRHR1, CSDC2, HHHL1, SCARA3, SOWAHD
C5	cytokine	0.04560	CRP, IL23A, SMAD7
Cyclin D	group	0.04660	SOX2
SCGB3A2	other	0.04660	SMAD7
ZNF21	other	0.04660	ZNF423
SOX2-OCT4	complex	0.04660	SOX2
PDSSB	other	0.04660	SOX2
borate oil	chemical drug	0.04660	IL23A
enzalutamide	chemical drug	0.04660	SOX2
SLC22A1	transporter	0.04660	SSTR1
FTGS	enzyme	0.04660	DUSP4
TBL1XR1	transcription regulator	0.04660	SMAD7
miR-4735-5p (miRNAs w/seed CUAAUUU)	mature microRNA	0.04690	OND, ZDHHC15
PTPN1	phosphatase	0.04690	IL23A, SMAD7
carboplatin	chemical drug	0.04690	CACNG5, SOX2
miR-490-5p (miRNAs w/seed CAUGGAU)	mature microRNA	0.04730	ADGRE3, COL6A1, KCNMA1, PCDHA1, SOX2, ZDHHC15
DCN	other	0.04800	S1PR1, SDC1
SUZ12	enzyme	0.04940	HOXB5, KCNMA1, PAX7
miR-4639-5p (miRNAs w/seed UGCUAAG)	mature microRNA	0.04980	CCDC144NL, FAM26D, GJC1, KCNMA1, S1PR1, SIX3

Legends to supplemental figures

Figure S1. Three independent confirmation datasets were used to validate the pattern of *RINF* mRNA expression profile during erythroid maturation of human hematopoietic progenitors cultured *in vitro*. (A) *CXXC5* mRNA expression profile was obtained by querying the Human Erythroblast Maturation Database described by Merryweather-Clarke *et al.*⁴⁴ PBMC-derived erythroblasts from 38 adult donors were grown *in vitro*. Cells at the CFU-E, Pro-E, Int-E and Late-E stages were sorted by FACS according to CD36, CD71 and glycophorin A expression. (B) *CXXC5* mRNA expression data were extracted from an RNA-seq dataset performed by An *et al.*⁴⁵ CD34+ cells from cord blood were cultured in a 3-phases culture system to produce primary human erythroid cells at different stages of terminal differentiation. Erythroblastic populations were isolated through sorting by FACS according to expression of cell surface markers glycophorin A, band 3, and α 4-integrin. (C) *CXXC5* mRNA expression was extracted from a public microarray dataset performed by Keller *et al.*⁴⁶ Briefly, CD34+ cells isolated from adult PBMC were cultured in a serum-free medium supplemented with IL3, SCF, and EPO for the indicated number of days.

Figure S2. *RINF* loss-of-expression in human CD34+ is associated with an accelerated downregulation of molecular markers (*cKIT* and *PU.1*). (A) Histogram of relative mRNA expression determined by quantitative RT-PCR for *RINF* (left panel), *cKIT* (middle panel) and *PU.1* (right panel). *PU.1* and *c-KIT* mRNA are known to be downregulated upon erythroid maturation and are here used as markers. In the *RINF* knocked-down conditions (black bars), the downregulation of *c-KIT* and *PU.1* mRNA preceded of at least three days the one observed in control cells, in agreement with an accelerated maturation.

Figure S3. *RINF* loss-of-expression in human CD34+ is associated with an increased number of BFU-E derived colonies, and a decreased number of granulocytic colonies (CFU-G). Human CD34+ cells were isolated from bone marrow of healthy donors and transduced with a lentiviral vector that drives shRNA expression (pLKO.1 or pTRIPDU3). Cells were then seeded (500 cells per well) into methycellulose plates containing cytokines (IL3, SCF, G-CSF, GM-CSF, and EPO) enabling the formation of erythroid colonies (both large and small BFU-E), myeloid

colonies (CFU-G, CFU-M, or CFU-GM), or mixed colonies (CFU-GEMM). Colony Forming Cells were counted at 14 days of culture. **(A)** Schematic representation of the pLKO.1 (upper panel) or the pTRIPDU3 (lower panel) lentiviral vector used to express a short hairpin RNA. The specificity and the efficacy of the sequences were previously described.⁸ The pLKO.1 lentiviral vector drives the expression of the shRNA under a U6 promoter and puromycin resistant gene under a PGK promoter. The pTRIPDU3 vector drives the expression of the shRNA under a H1 promoter and the GFP expression gene under an EF1 α promoter. **(B)** Human CD34⁺ cells were transduced with the pLKO.1 vector or pTRIPDU3 vector. Of note, pLKO1-transduced cells were not selected with puromycin and pTRIPDU3-transduced cells were not FACS-sorted for GFP expression. The transduction rate was estimated at 65% (\pm 10% according to the donors). **(C)** and **(D)** Histograms represent the pooled data of the three or four donors respectively infected with the pLKO.1 or pTRIPDU3 lentiviral vector system (here, in non-selected and non-sorted conditions, respectively). At least 200 hundred colonies per donor were counted. For the statistical analysis, a Fisher's exact test was performed (***: $p < 0.0001$). **(E)** The gating strategy used for MEP(Megakaryocyte–Erythroid Progenitor)-enrichment is shown. The protocol is adapted from Manz *et al.*⁵⁹ For this, CD34⁺ cells were isolated from primary human bone marrow and stained with CD34, CD38, CD10, CD123 and CD45RA (see supplemental method).

Figure S4. According to Ingenuity Pathway Analysis, the list of genes (n=193) commonly downregulated by shRNA-mediated *RINF* knockdown in K562 and UT7_{5.3} is enriched in genes of the TGF β signaling pathway and SMAD3 target genes, including *SMAD7*. Our microarray experiments were performed with HTA 2.0 Human Transcriptome Array 2.0 GeneChip, (Affymetrix) and were previously described.¹⁷ **(A)** Venn diagram representing the number of genes down-regulated after RINF knockdown. 193 genes were commonly down-regulated in K562 and UT7_{5.3} cell lines with at least a 1.25 fold-change (log 2). In absolute value, this cut-off correspond to a 2.38 expression fold-change. We applied QIAGEN's Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®, QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity) tool to this gene list. IPA revealed the TGF β signaling pathway. Moreover, the upstream transcription factor analysis of this gene list was especially enriched in target genes of SMAD3, a key transcription factor mediating the canonical TGF β signaling (see supplementary Table

2). **(B)** Among the list of 193 genes, 39 were also commonly down-regulated in MV4-11 cell line. This gene list is presented as well as the heatmap of the 39 genes representing the relative mRNA expression fold-change (log2) between shRNA-RINF and shRNA-Control expressing cell lines. *CXXC5* and *SMAD7* were here indicated in red.

Figure S5. TGF β ligands and *SMAD7* mRNA expression profiles in confirmation datasets of primary human hematopoietic progenitors. (A) TGF β ligands expression profiles were extracted from our proteomic analyses of cord-blood derived CD34+ cells (Gauthier EF *et al.*³⁸). TGF β 1 and TGF β RI were highly expressed at the Prog1-Prog2 (i.e. D1-D3 of EPO). These data are in agreement with an important autocrine signaling in early steps of erythroid maturation. **(B)** *RINF* and *SMAD7* gene expression data were extracted from a previously described microarray dataset performed by Pellagatti A *et al.*⁴⁸ In this study, CD34+ cells were isolated from adult bone-marrow (n=11) or MDS patients (not shown). A correlation analysis was performed with the Spearman rho (for non-parametric analysis). A strong correlation coefficient was noticed, (rho = 0.791), 95% confidence interval (0.345 to 0.945), P (two-tailed)= 0.005 (**). *RINF* (*CXXC5*) and *SMAD7* mRNA levels correlate in CD34+ cells isolated from bone marrow of healthy donors (n=11) (Spearman, 0.791, p<0.005 **).

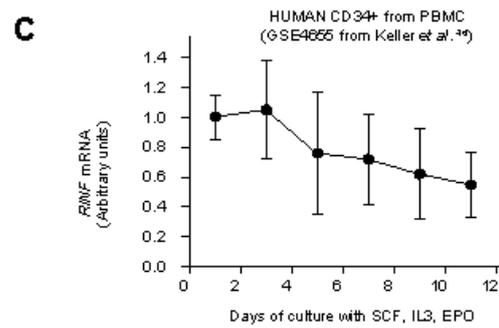
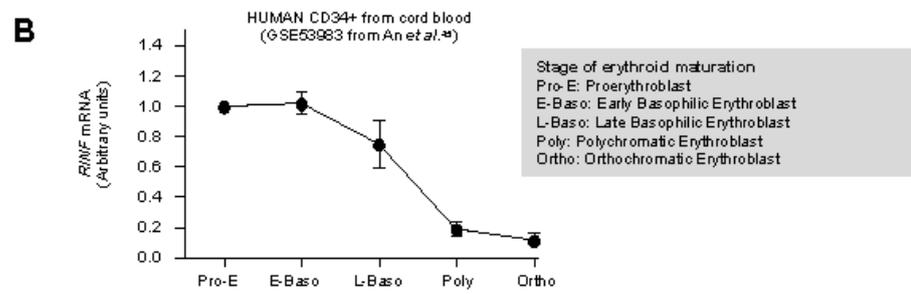
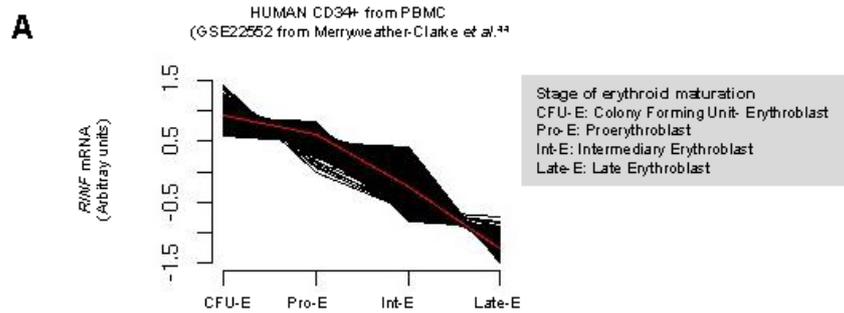


Figure S1
Astori et al.

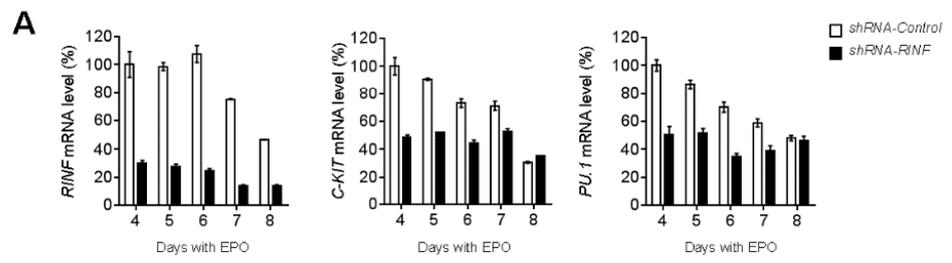


Figure S2
Astori et al.

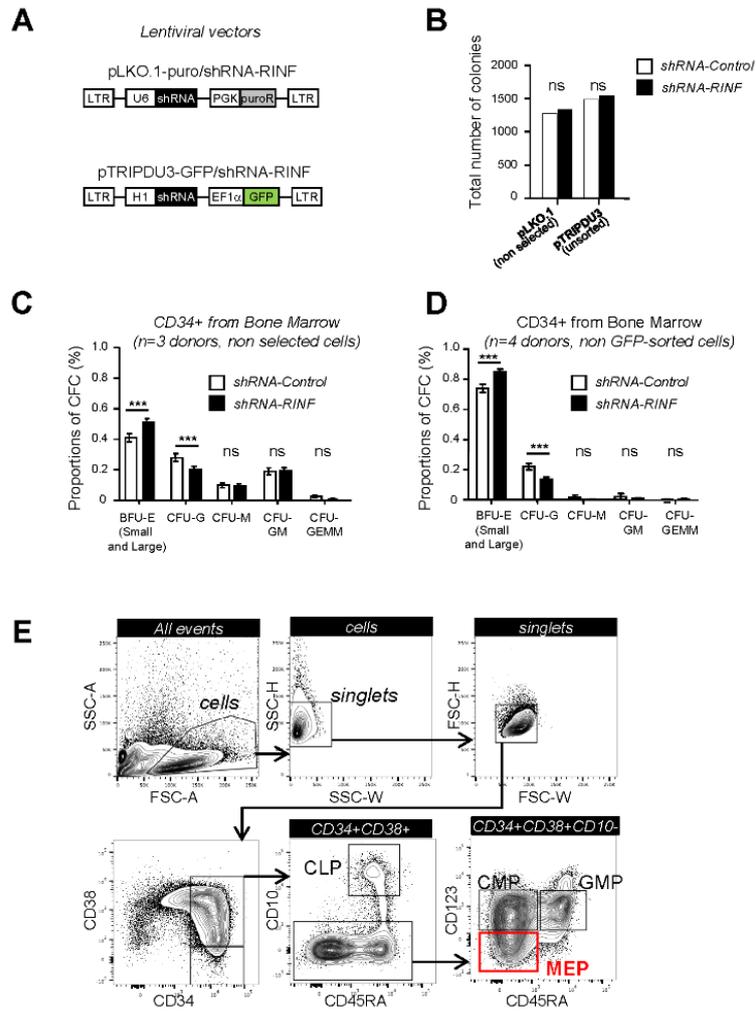


Figure S3
Astori et al.

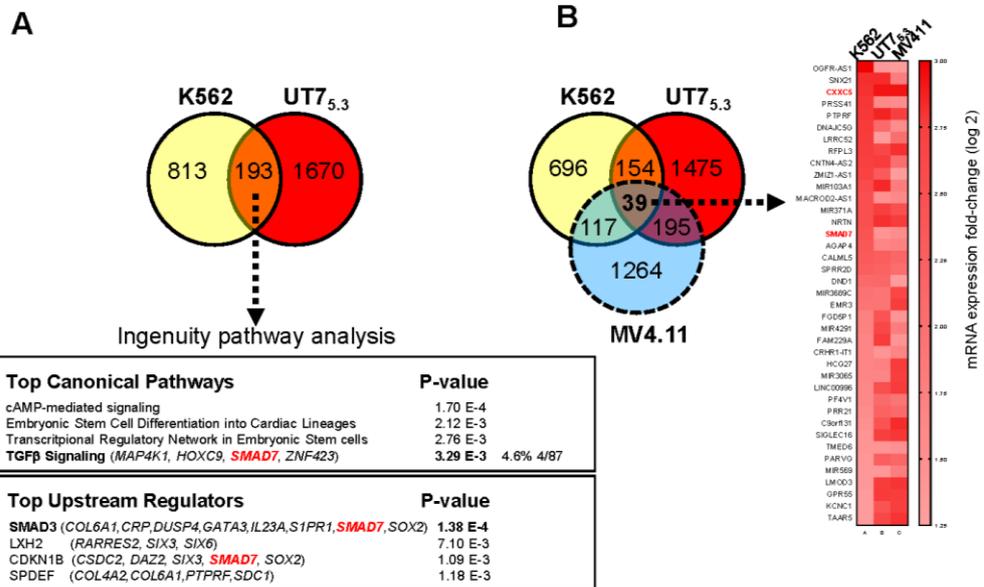


Figure S4
Astori et al.

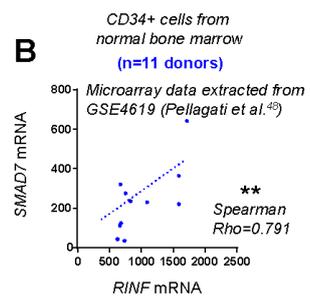
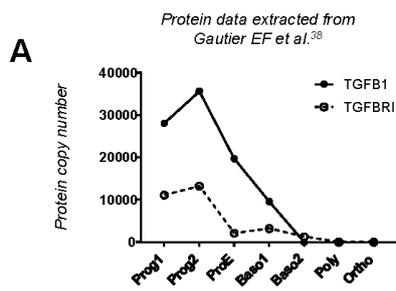


Figure S5
Astori et al.

Bibliographie

Adolfsson, Jörgen, Ole Johan Borge, David Bryder, Kim Theilgaard-Mönch, Ingbritt Åstrand-Grundström, Ewa Sitnicka, Yutaka Sasaki, et Sten E. W. Jacobsen. 2001. « Upregulation of Flt3 Expression within the Bone Marrow Lin⁻Sca1⁺c-Kit⁺ Stem Cell Compartment Is Accompanied by Loss of Self-Renewal Capacity ». *Immunity* 15 (4): 659-69. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00220-5).

Agathocleous, Michalis, Corbin E. Meacham, Rebecca J. Burgess, Elena Piskounova, Zhiyu Zhao, Genevieve M. Crane, Brianna L. Cowin, et al. 2017. « Ascorbate Regulates Haematopoietic Stem Cell Function and Leukaemogenesis ». *Nature*, août. <https://doi.org/10.1038/nature23876>.

Agoram, Balaji, Ken Aoki, Sameer Doshi, Colin Gegg, Graham Jang, Graham Molineux, Linda Narhi, et Steve Elliott. 2009. « Investigation of the Effects of Altered Receptor Binding Activity on the Clearance of Erythropoiesis-Stimulating Proteins: Nonerythropoietin Receptor-Mediated Pathways May Play a Major Role ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98 (6): 2198-2211. <https://doi.org/10.1002/jps.21578>.

AKEL, SALEM, CARI PETROW-SADOWSKI, MARY J LAUGHLIN, et FRANCIS W RUSCETTI. s. d. « Neutralization of Autocrine Transforming Growth Factor- β in Human Cord Blood CD34⁺CD38⁻Lin⁻ Cells Promotes Stem-Cell-Factor-Mediated Erythropoietin-Independent Early Erythroid Progenitor Development and Reduces Terminal Differentiation », 12.

An, X. P., J. X. Hou, G. Li, J. Y. Peng, X. Q. Liu, H. Y. Liu, W. P. Xiao, J. G. Wang, Y. X. Song, et B. Y. Cao. 2012. « Analysis of Differentially Expressed Genes in Ovaries of Polytocous versus Monotocous Dairy Goats Using Suppressive Subtractive Hybridization ». *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* 47 (3): 498-503. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01910.x>.

An, X., V. P. Schulz, J. Li, K. Wu, J. Liu, F. Xue, J. Hu, N. Mohandas, et P. G. Gallagher. 2014. « Global Transcriptome Analyses of Human and Murine Terminal Erythroid Differentiation ». *Blood* 123 (22): 3466-77. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-548305>.

Andersson, Therese, Erik Södersten, Joshua K. Duckworth, Anna Cascante, Nicolas Fritz, Paola Sacchetti, Igor Cervenka, Vitezslav Bryja, et Ola Hermanson. 2009. « CXXC5 Is a

Novel BMP4-Regulated Modulator of Wnt Signaling in Neural Stem Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (6): 3672-81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808119200>.

Andrews, N. C., K. J. Kotkow, P. A. Ney, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, et S. H. Orkin. 1993. « The Ubiquitous Subunit of Erythroid Transcription Factor NF-E2 Is a Small Basic-Leucine Zipper Protein Related to the v-Maf Oncogene ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (24): 11488-92.

Antonchuk, Jennifer, Guy Sauvageau, et R. Keith Humphries. 2002. « HOXB4-Induced Expansion of Adult Hematopoietic Stem Cells Ex Vivo ». *Cell* 109 (1): 39-45.

Astori, Andrey, Hanne Kristin Fredly, Thomas Aquinas Aloysius, Lars Bullinger, Véronique Mansat-De Mas, Pierre de la Grange, Francois Delhommeau, et al. 2013. « CXXC5 (Retinoid-Inducible Nuclear Factor, RINF) Is a Potential Therapeutic Target in High-Risk Human Acute Myeloid Leukemia ». *Oncotarget* 4 (9). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1195>.

Avruch, J., A. Khokhlatchev, J. M. Kyriakis, Z. Luo, G. Tzivion, D. Vavvas, et X. F. Zhang. 2001. « Ras Activation of the Raf Kinase: Tyrosine Kinase Recruitment of the MAP Kinase Cascade ». *Recent Progress in Hormone Research* 56: 127-55.

Bai, Xiaoying, Jonghwan Kim, Zhongan Yang, Michael J. Jurynek, Thomas E. Akie, Joseph Lee, Jocelyn LeBlanc, et al. 2010. « TIF1gamma Controls Erythroid Cell Fate by Regulating Transcription Elongation ». *Cell* 142 (1): 133-43. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.028>.

Bamberger, Casimir, Agnes Schärer, Maria Antsiferova, Birte Tychsen, Sandra Pankow, Mischa Müller, Thomas Rüllicke, Ralf Paus, et Sabine Werner. 2005. « Activin Controls Skin Morphogenesis and Wound Repair Predominantly via Stromal Cells and in a Concentration-Dependent Manner via Keratinocytes ». *The American Journal of Pathology* 167 (3): 733-47. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62047-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62047-0).

Bank, Arthur. 2006. « Regulation of Human Fetal Hemoglobin: New Players, New Complexities ». *Blood* 107 (2): 435-43. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-2113>.

Bannister, A. J., et T. Kouzarides. 1996. « The CBP Co-Activator Is a Histone Acetyltransferase ». *Nature* 384 (6610): 641-43. <https://doi.org/10.1038/384641a0>.

Basu, Priyadarshi, Tina K. Lung, Wafaa Lemsaddek, Thanh Giang Sargent, David C. Williams, Mohua Basu, Latasha C. Redmond, Jerry B. Lingrel, Jack L. Haar, et Joyce A.

Lloyd. 2007. « EKLf and KLF2 Have Compensatory Roles in Embryonic Beta-Globin Gene Expression and Primitive Erythropoiesis ». *Blood* 110 (9): 3417-25.

<https://doi.org/10.1182/blood-2006-11-057307>.

Batard, P., M. N. Monier, N. Fortunel, K. Ducos, P. Sansilvestri-Morel, T. Phan, A. Hatzfeld, et J. A. Hatzfeld. 2000. « TGF-(Beta)1 Maintains Hematopoietic Immaturity by a Reversible Negative Control of Cell Cycle and Induces CD34 Antigen up-Modulation ». *Journal of Cell Science* 113 (Pt 3) (février): 383-90.

Bauer, A., F. Tronche, O. Wessely, C. Kellendonk, H. M. Reichardt, P. Steinlein, G. Schütz, et H. Beug. 1999. « The Glucocorticoid Receptor Is Required for Stress Erythropoiesis ». *Genes & Development* 13 (22): 2996-3002.

Benedetti, Ines, Angelo M. De Marzo, Jan Geliebter, et Niradiz Reyes. 2017. « CXXC5 Expression in Prostate Cancer: Implications for Cancer Progression ». *International Journal of Experimental Pathology* 98 (4): 234-43. <https://doi.org/10.1111/iep.12241>.

Benveniste, Patricia, Catherine Frelin, Salima Janmohamed, Mary Barbara, Robert Herrington, Deborah Hyam, et Norman N. Iscove. 2010. « Intermediate-Term Hematopoietic Stem Cells with Extended but Time-Limited Reconstitution Potential ». *Cell Stem Cell* 6 (1): 48-58. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.11.014>.

Berthier, R., O. Valiron, A. Schweitzer, et G. Marguerie. 1993. « Serum-Free Medium Allows the Optimal Growth of Human Megakaryocyte Progenitors Compared with Human Plasma Supplemented Cultures: Role of TGF Beta ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 11 (2): 120-29. <https://doi.org/10.1002/stem.5530110207>.

Bettin, Alfonso, Ismael Reyes, et Niradiz Reyes. 2016. « Gene Expression Profiling of Prostate Cancer–Associated Genes Identifies Fibromodulin as Potential Novel Biomarker for Prostate Cancer ». *The International Journal of Biological Markers* 31 (2): 153-62. <https://doi.org/10.5301/jbm.5000184>.

Bhagat, Tushar D, Li Zhou, Lubomir Sokol, Rachel Kessel, Gisela Caceres, Krishna Gundabolu, Roni Tamari, et al. 2013. « MiR-21 Mediates Hematopoietic Suppression in MDS by Activating TGF-b Signaling » 121 (15): 8.

Bhatia, Mickie, Dominique Bonnet, Ursula Kapp, Jean C.Y. Wang, Barbara Murdoch, et John E. Dick. 1997. « Quantitative Analysis Reveals Expansion of Human Hematopoietic

- Repopulating Cells After Short-Term Ex Vivo Culture ». *The Journal of Experimental Medicine* 186 (4): 619-24. <https://doi.org/10.1084/jem.186.4.619>.
- Bianchi, Nicoletta, Cristina Zuccato, Alessia Finotti, Ilaria Lampronti, Monica Borgatti, et Roberto Gambari. 2012. « Involvement of MiRNA in Erythroid Differentiation ». *Epigenomics* 4 (1): 51-65. <https://doi.org/10.2217/epi.11.104>.
- Bierie, Brian, et Harold L. Moses. 2006. « TGF-Beta and Cancer ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 17 (1-2): 29-40. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.09.006>.
- Bird, A. P. 1986. « CpG-Rich Islands and the Function of DNA Methylation ». *Nature* 321 (6067): 209-13. <https://doi.org/10.1038/321209a0>.
- Bird, Adrian. 2002. « DNA Methylation Patterns and Epigenetic Memory ». *Genes & Development* 16 (1): 6-21. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>.
- Birkmann, Josef, Sadik Oez, Manfred Smetak, Gerwin Kaiser, Herbert Kappauf, et Walter M. Gallmeier. 1997. « Effects of Recombinant Human Thrombopoietin Alone and in Combination with Erythropoietin and Early-Acting Cytokines on Human Mobilized Purified CD34+ Progenitor Cells Cultured in Serum-Depleted Medium ». *STEM CELLS* 15 (1): 18-32. <https://doi.org/10.1002/stem.150018>.
- Blank, U., G. Karlsson, J. L. Moody, T. Utsugisawa, M. Magnusson, S. Singbrant, J. Larsson, et S. Karlsson. 2006. « Smad7 Promotes Self-Renewal of Hematopoietic Stem Cells ». *Blood* 108 (13): 4246-54. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-005611>.
- Blobel, G. A., et S. H. Orkin. 1996. « Estrogen-Induced Apoptosis by Inhibition of the Erythroid Transcription Factor GATA-1. » *Molecular and Cellular Biology* 16 (4): 1687-94. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.4.1687>.
- Blobel, G A, C A Sieff, et S H Orkin. 1995. « Ligand-Dependent Repression of the Erythroid Transcription Factor GATA-1 by the Estrogen Receptor. » *Molecular and Cellular Biology* 15 (6): 3147-53. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.6.3147>.
- Bockamp, E. O., F. McLaughlin, A. M. Murrell, B. Göttgens, L. Robb, C. G. Begley, et A. R. Green. 1995. « Lineage-Restricted Regulation of the Murine SCL/TAL-1 Promoter ». *Blood* 86 (4): 1502-14.
- Boergemann, J. H., J. Kopf, P. B. Yu, et P. Knaus. 2010. « Dorsomorphin and LDN-193189 Inhibit BMP-Mediated Smad, P38 and Akt Signalling in C2C12 Cells ». *The International*

Journal of Biochemistry & Cell Biology 42 (11): 1802-7.

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.07.018>.

Bohmer, R. M. 2004. « IL-3-Dependent Early Erythropoiesis Is Stimulated by Autocrine Transforming Growth Factor Beta ». *Stem Cells* 22 (2): 216-24.

<https://doi.org/10.1634/stemcells.22-2-216>.

Boulanger, Laurent, Denise E. Sabatino, Ellice Y. Wong, Amanda P. Cline, Lisa J. Garrett, Michel Garbarz, Didier Dhermy, David M. Bodine, et Patrick G. Gallagher. 2002. « Erythroid Expression of the Human Alpha-Spectrin Gene Promoter Is Mediated by GATA-1- and NF-E2-Binding Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (44): 41563-70.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M208184200>.

Bouscary, Didier, Frédéric Pene, Yann-Erick Claessens, Odile Muller, Stany Chrétien, Michaëla Fontenay-Roupie, Sylvie Gisselbrecht, Patrick Mayeux, et Catherine Lacombe. 2003. « Critical Role for PI 3-Kinase in the Control of Erythropoietin-Induced Erythroid Progenitor Proliferation ». *Blood* 101 (9): 3436-43. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2332>.

Boyer, A. S., I. I. Ayerinkas, E. B. Vincent, L. A. McKinney, D. L. Weeks, et R. B. Runyan. 1999. « TGFbeta2 and TGFbeta3 Have Separate and Sequential Activities during Epithelial-Mesenchymal Cell Transformation in the Embryonic Heart ». *Developmental Biology* 208 (2): 530-45. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9211>.

Boyer, Laurie A., Tong Ihn Lee, Megan F. Cole, Sarah E. Johnstone, Stuart S. Levine, Jacob P. Zucker, Matthew G. Guenther, et al. 2005. « Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells ». *Cell* 122 (6): 947-56.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020>.

Broudy, V. C., N. Lin, M. Brice, B. Nakamoto, et T. Papayannopoulou. 1991.

« Erythropoietin Receptor Characteristics on Primary Human Erythroid Cells ». *Blood* 77 (12): 2583-90.

Bruns, Ingmar, Daniel Lucas, Sandra Pinho, Jalal Ahmed, Michele P Lambert, Yuya Kunisaki, Christoph Scheiermann, et al. 2014. « Megakaryocytes Regulate Hematopoietic Stem Cell Quiescence through CXCL4 Secretion ». *Nature Medicine* 20 (11): 1315-20.

<https://doi.org/10.1038/nm.3707>.

Busch, Katrin, Kay Klapproth, Melania Barile, Michael Flossdorf, Tim Holland-Letz, Susan M. Schlenner, Michael Reth, Thomas Höfer, et Hans-Reimer Rodewald. 2015. « Fundamental Properties of Unperturbed Haematopoiesis from Stem Cells in Vivo ». *Nature* 518 (7540): 542-46. <https://doi.org/10.1038/nature14242>.

Byers, T. J., et D. Branton. 1985. « Visualization of the Protein Associations in the Erythrocyte Membrane Skeleton ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (18): 6153-57.

Cabezas-Wallscheid, Nina, Florian Buettner, Pia Sommerkamp, Daniel Klimmeck, Luisa Ladel, Frederic B. Thalheimer, Daniel Pastor-Flores, et al. 2017. « Vitamin A-Retinoic Acid Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Dormancy ». *Cell* 169 (5): 807-823.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.018>.

Calvi, L. M., G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, et al. 2003. « Osteoblastic Cells Regulate the Haematopoietic Stem Cell Niche ». *Nature* 425 (6960): 841-46. <https://doi.org/10.1038/nature02040>.

Cancilla, Belinda, Renea A Jarred, Hong Wang, Sally L Mellor, Gerald R Cunha, et Gail P Risbridger. 2001. « Regulation of Prostate Branching Morphogenesis by Activin A and Follistatin ». *Developmental Biology* 237 (1): 145-58. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0364>.

Capellera-Garcia, Sandra, Julian Pulecio, Kishori Dhulipala, Kavitha Siva, Violeta Rayon-Estrada, Sofie Singbrant, Mikael N.E. Sommarin, et al. 2016. « Defining the Minimal Factors Required for Erythropoiesis through Direct Lineage Conversion ». *Cell Reports* 15 (11): 2550-62. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.027>.

Cardoso, A. A., M. L. Li, P. Batard, A. Hatzfeld, E. L. Brown, J. P. Levesque, H. Sookdeo, B. Panterne, P. Sansilvestri, et S. C. Clark. 1993. « Release from Quiescence of CD34+ CD38- Human Umbilical Cord Blood Cells Reveals Their Potentiality to Engraft Adults ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (18): 8707-11.

Challen, Grant A., Nathan C. Boles, Stuart M. Chambers, et Margaret A. Goodell. 2010. « Distinct Hematopoietic Stem Cell Subtypes Are Differentially Regulated by TGF-Beta1 ». *Cell Stem Cell* 6 (3): 265-78. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.02.002>.

Chasis, Joel Anne. 2006. « Erythroblastic Islands: Specialized Microenvironmental Niches for Erythropoiesis ». *Current Opinion in Hematology* 13 (3): 137-41.

<https://doi.org/10.1097/01.moh.0000219657.57915.30>.

Chen, K., J. Liu, S. Heck, J. A. Chasis, X. An, et N. Mohandas. 2009. « Resolving the Distinct Stages in Erythroid Differentiation Based on Dynamic Changes in Membrane Protein Expression during Erythropoiesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (41): 17413-18. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909296106>.

Chen, Qian, Hanying Chen, Dawei Zheng, Chenzhong Kuang, Hong Fang, Bingyu Zou, Wuqiang Zhu, et al. 2009. « Smad7 Is Required for the Development and Function of the Heart ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (1): 292-300.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M807233200>.

Cheshier, S. H., S. J. Morrison, X. Liao, et I. L. Weissman. 1999. « In Vivo Proliferation and Cell Cycle Kinetics of Long-Term Self-Renewing Hematopoietic Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (6): 3120-25.

Chou, Stella T., Eugene Khandros, L. Charles Bailey, Kim E. Nichols, Christopher R. Vakoc, Yu Yao, Zan Huang, et al. 2009. « Graded Repression of PU.1/Sfpi1 Gene Transcription by GATA Factors Regulates Hematopoietic Cell Fate ». *Blood* 114 (5): 983-94.

<https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-207944>.

Chow, Andrew, Matthew Huggins, Jalal Ahmed, Daigo Hashimoto, Daniel Lucas, Yuya Kunisaki, Sandra Pinho, et al. 2013. « CD169⁺ Macrophages Provide a Niche Promoting Erythropoiesis under Homeostasis and Stress ». *Nature Medicine* 19 (4): 429-36.

<https://doi.org/10.1038/nm.3057>.

Christensen, J. L., et I. L. Weissman. 2001. « Flk-2 Is a Marker in Hematopoietic Stem Cell Differentiation: A Simple Method to Isolate Long-Term Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (25): 14541-46. <https://doi.org/10.1073/pnas.261562798>.

Cimmino, Luisa, Igor Dolgalev, Yubao Wang, Akihide Yoshimi, Gaëlle H. Martin, Jingjing Wang, Victor Ng, et al. 2017. « Restoration of TET2 Function Blocks Aberrant Self-Renewal and Leukemia Progression ». *Cell* 170 (6): 1079-1095.e20.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.032>.

Constantinescu, null, null Ghaffari, et null Lodish. 1999. « The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 10 (1): 18-23.

Coulondre, C., J. H. Miller, P. J. Farabaugh, et W. Gilbert. 1978. « Molecular Basis of Base Substitution Hotspots in Escherichia Coli ». *Nature* 274 (5673): 775-80.

Cui, Zhibin, Yingjia Shen, Kenny H. Chen, Suresh K. Mittal, Jer-Yen Yang, et GuangJun Zhang. 2017. « KANK1 Inhibits Cell Growth by Inducing Apoptosis Through Regulating CXXC5 in Human Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors ». *Scientific Reports* 7 (janvier): 40325. <https://doi.org/10.1038/srep40325>.

Cumano, Ana, et Isabelle Godin. 2007. « Ontogeny of the Hematopoietic System ». *Annual Review of Immunology* 25 (1): 745-85.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141538>.

Dai, Chun-Hua, James O Price, Thomas Brunner, et Sanford B Krantz. s. d. « Fas Ligand Is Present in Human Erythroid Colony-Forming Cells and Interacts With Fas Induced by Interferon γ to Produce Erythroid Cell Apoptosis », 9.

David, Charles J., et Joan Massagué. 2018. « Contextual Determinants of TGF β Action in Development, Immunity and Cancer ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (7): 419-35. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0007-0>.

Davis, Brandi N., Aaron C. Hilyard, Peter H. Nguyen, Giorgio Lagna, et Akiko Hata. 2010. « Smad Proteins Bind a Conserved RNA Sequence to Promote MicroRNA Maturation by Drosha ». *Molecular Cell* 39 (3): 373-84. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.011>.

Dawlaty, Meelad M., Achim Breiling, Thuc Le, M. Inmaculada Barrasa, Günter Raddatz, Qing Gao, Benjamin E. Powell, et al. 2014. « Loss of Tet Enzymes Compromises Proper Differentiation of Embryonic Stem Cells ». *Developmental Cell* 29 (1): 102-11.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.03.003>.

Dawlaty, Meelad M., Achim Breiling, Thuc Le, Günter Raddatz, M. Inmaculada Barrasa, Albert W. Cheng, Qing Gao, et al. 2013. « Combined Deficiency of Tet1 and Tet2 Causes Epigenetic Abnormalities but Is Compatible with Postnatal Development ». *Developmental Cell* 24 (3): 310-23. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.12.015>.

- Dazy, Sébastien, Francesca Damiola, Nicolas Parisey, Hartmut Beug, et Olivier Gandrillon. 2003. « The MEK-1/ERKs Signalling Pathway Is Differentially Involved in the Self-Renewal of Early and Late Avian Erythroid Progenitor Cells ». *Oncogene* 22 (58): 9205-16.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207049>.
- De Maria, R., U. Testa, L. Luchetti, A. Zeuner, G. Stassi, E. Pelosi, R. Riccioni, N. Felli, P. Samoggia, et C. Peschle. 1999. « Apoptotic Role of Fas/Fas Ligand System in the Regulation of Erythropoiesis ». *Blood* 93 (3): 796-803.
- De Maria, R., A. Zeuner, A. Eramo, C. Domenichelli, D. Bonci, F. Grignani, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, U. Testa, et C. Peschle. 1999. « Negative Regulation of Erythropoiesis by Caspase-Mediated Cleavage of GATA-1 ». *Nature* 401 (6752): 489-93.
<https://doi.org/10.1038/46809>.
- Del Rizzo, D. F., D. Eskinazi, et A. A. Axelrad. 1990. « Interleukin 3 Opposes the Action of Negative Regulatory Protein (NRP) and of Transforming Growth Factor-Beta (TGF-Beta) in Their Inhibition of DNA Synthesis of the Erythroid Stem Cell BFU-E ». *Experimental Hematology* 18 (2): 138-42.
- Delhommeau, François, Sabrina Dupont, Véronique Della Valle, Chloé James, Severine Trannoy, Aline Massé, Olivier Kosmider, et al. 2009. « Mutation in TET2 in Myeloid Cancers ». *The New England Journal of Medicine* 360 (22): 2289-2301.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810069>.
- Devaney, J M, S Wang, S Funda, J Long, D J Taghipour, R Tbaishat, P Furbert-Harris, M Ittmann, et B Kwabi-Addo. 2013. « Identification of Novel DNA-Methylated Genes That Correlate with Human Prostate Cancer and High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia ». *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 16 (4): 292-300.
<https://doi.org/10.1038/pcan.2013.21>.
- Díaz, Víctor, Elena Gammella, Stefania Recalcati, Paolo Santambrogio, Arianne Monge Naldi, Johannes Vogel, Max Gassmann, et Gaetano Cairo. 2013. « Liver Iron Modulates Hcpidin Expression during Chronically Elevated Erythropoiesis in Mice ». *Hepatology* 58 (6): 2122-32. <https://doi.org/10.1002/hep.26550>.
- Ding, Lei, Thomas L. Saunders, Grigori Enikolopov, et Sean J. Morrison. 2012. « Endothelial and Perivascular Cells Maintain Haematopoietic Stem Cells ». *Nature* 481 (7382): 457-62.
<https://doi.org/10.1038/nature10783>.

- Dokal, Inderjeet, et Tom Vulliamy. 2010. « Inherited Bone Marrow Failure Syndromes ». *Haematologica* 95 (8): 1236-40. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.025619>.
- Dou, Yali, Thomas A. Milne, Alexander J. Ruthenburg, Seunghee Lee, Jae Woon Lee, Gregory L. Verdine, C. David Allis, et Robert G. Roeder. 2006. « Regulation of MLL1 H3K4 Methyltransferase Activity by Its Core Components ». *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (8): 713-19. <https://doi.org/10.1038/nsmb1128>.
- Douer, D, et H P Koeffler. 1982. « Retinoic acid enhances growth of human early erythroid progenitor cells in vitro. » *Journal of Clinical Investigation* 69 (4): 1039-41.
- Dubois, C. M., R. Neta, J. R. Keller, S. E. Jacobsen, J. J. Oppenheim, et F. Ruscetti. 1993. « Hematopoietic Growth Factors and Glucocorticoids Synergize to Mimic the Effects of IL-1 on Granulocyte Differentiation and IL-1 Receptor Induction on Bone Marrow Cells in Vivo ». *Experimental Hematology* 21 (2): 303-10.
- Dussiot, Michael, Thiago T Maciel, Aurélie Fricot, Céline Chartier, Olivier Negre, Joel Veiga, Damien Grapton, et al. 2014. « An Activin Receptor IIA Ligand Trap Corrects Ineffective Erythropoiesis in β -Thalassemia ». *Nature Medicine* 20 (4): 398-407. <https://doi.org/10.1038/nm.3468>.
- Dutt, S., A. Narla, K. Lin, A. Mullally, N. Abayasekara, C. Megerdichian, F. H. Wilson, et al. 2011. « Haploinsufficiency for Ribosomal Protein Genes Causes Selective Activation of P53 in Human Erythroid Progenitor Cells ». *Blood* 117 (9): 2567-76. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-295238>.
- Ebert, Benjamin L., Jennifer Pretz, Jocelyn Bosco, Cindy Y. Chang, Pablo Tamayo, Naomi Galili, Azra Raza, et al. 2008. « Identification of RPS14 as a 5q- Syndrome Gene by RNA Interference Screen ». *Nature* 451 (7176): 335-39. <https://doi.org/10.1038/nature06494>.
- Elagib, Kamaleldin E., Frederick K. Racke, Michael Mogass, Rina Khetawat, Lorrie L. Delehanty, et Adam N. Goldfarb. 2003. « RUNX1 and GATA-1 Coexpression and Cooperation in Megakaryocytic Differentiation ». *Blood* 101 (11): 4333-41. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2708>.
- Elliott, Steve, Angus Sinclair, Helen Collins, Linda Rice, et Wolfgang Jelkmann. 2014. « Progress in Detecting Cell-Surface Protein Receptors: The Erythropoietin Receptor

Example ». *Annals of Hematology* 93 (2): 181-92. <https://doi.org/10.1007/s00277-013-1947-2>.

Ema, Hideo, Kazuhiro Sudo, Jun Seita, Azusa Matsubara, Yohei Morita, Mitsujiro Osawa, Kiyoshi Takatsu, Satoshi Takaki, et Hiromitsu Nakauchi. 2005. « Quantification of Self-Renewal Capacity in Single Hematopoietic Stem Cells from Normal and Lnk-Deficient Mice ». *Developmental Cell* 8 (6): 907-14. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.03.019>.

Endo, Tomoyuki, Atsushi Odb, Ikumi Satoh, Yoshihito Haseyama, Mitsufumi Nishio, Kazuki Koizumi, Hidenori Takashima, et al. 2001. « Stem Cell Factor Protects C-Kit+ Human Primary Erythroid Cells from Apoptosis ». *Experimental Hematology* 29 (7): 833-41. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(01\)00660-9](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(01)00660-9).

Eppert, K., S. W. Scherer, H. Ozcelik, R. Pirone, P. Hoodless, H. Kim, L. C. Tsui, et al. 1996. « MADR2 Maps to 18q21 and Encodes a TGFbeta-Regulated MAD-Related Protein That Is Functionally Mutated in Colorectal Carcinoma ». *Cell* 86 (4): 543-52.

Eshghi, Shawdee, Mariette G. Voglezang, Richard O. Hynes, Linda G. Griffith, et Harvey F. Lodish. 2007. « Alpha4beta1 Integrin and Erythropoietin Mediate Temporally Distinct Steps in Erythropoiesis: Integrins in Red Cell Development ». *The Journal of Cell Biology* 177 (5): 871-80. <https://doi.org/10.1083/jcb.200702080>.

Farcas, Anca M., Neil P. Blackledge, Ian Sudbery, Hannah K. Long, Joanna F. McGouran, Nathan R. Rose, Sheena Lee, et al. 2012. « KDM2B Links the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to Recognition of CpG Islands ». *ELife*. 18 décembre 2012. <https://doi.org/10.7554/eLife.00205>.

Felli, Nadia, Laura Fontana, Elvira Pelosi, Rosanna Botta, Desirée Bonci, Francesco Facchiano, Francesca Liuzzi, et al. 2005. « MicroRNAs 221 and 222 Inhibit Normal Erythropoiesis and Erythroleukemic Cell Growth via Kit Receptor Down-Modulation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (50): 18081-86. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506216102>.

Felli, Nadia, Francesca Pedini, Paolo Romania, Mauro Biffoni, Ornella Morsilli, Germana Castelli, Simona Santoro, et al. 2009. « MicroRNA 223-Dependent Expression of LMO2 Regulates Normal Erythropoiesis ». *Haematologica* 94 (4): 479-86. <https://doi.org/10.3324/haematol.2008.002345>.

Fenaux, P., D. Haase, G. F. Sanz, V. Santini, C. Buske, et ESMO Guidelines Working Group. 2014. « Myelodysplastic Syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 25 Suppl 3 (septembre): iii57-69.

<https://doi.org/10.1093/annonc/mdu180>.

Ferreira, Rita, Kinuko Ohneda, Masayuki Yamamoto, et Sjaak Philipsen. 2005. « GATA1 Function, a Paradigm for Transcription Factors in Hematopoiesis ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (4): 1215-27. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.4.1215-1227.2005>.

Filleur, Stephanie, Jennifer Hirsch, Aline Wille, Margarete Schön, Christian Sell, Michael H Shearer, Thomas Nelius, et Ilse Wieland. 2009. « INTS6/DICE1 Inhibits Growth of Human Androgen-Independent Prostate Cancer Cells by Altering the Cell Cycle Profile and Wnt Signaling ». *Cancer Cell International* 9 (1): 28. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-9-28>.

FitzGerald, Kevin T., et Manuel O. Diaz. 1999. « MLL2: A New Mammalian Member of the Trx/MLL Family of Genes ». *Genomics* 59 (2): 187-92.

<https://doi.org/10.1006/geno.1999.5860>.

Flygare, J., V. R. Estrada, C. Shin, S. Gupta, et H. F. Lodish. 2011. « HIF1 Synergizes with Glucocorticoids to Promote BFU-E Progenitor Self-Renewal ». *Blood* 117 (12): 3435-44.

<https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-295550>.

Fortunel, Nicolas O., Antoinette Hatzfeld, et Jacques A. Hatzfeld. 2000. « Transforming Growth Factor- β : Pleiotropic Role in the Regulation of Hematopoiesis ». *Blood* 96 (6): 2022-36.

Frenette, Paul S., Sandra Pinho, Daniel Lucas, et Christoph Scheiermann. 2013.

« Mesenchymal Stem Cell: Keystone of the Hematopoietic Stem Cell Niche and a Stepping-Stone for Regenerative Medicine ». *Annual Review of Immunology* 31 (1): 285-316.

<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095919>.

Fried, W., T. Tichler, I. Dennenberg, J. Barone, et F. Wang. 1974. « Effects of Estrogens on Hematopoietic Stem Cells and on Hematopoiesis of Mice ». *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 83 (5): 807-15.

Frisan, Emilie, Julie Vandekerckhove, Aurélie de Thonel, Cécile Pierre-Eugène, Alexander Sternberg, Jean-Benoît Arlet, Célia Floquet, et al. 2012. « Defective Nuclear Localization of

Hsp70 Is Associated with Dyserythropoiesis and GATA-1 Cleavage in Myelodysplastic Syndromes ». *Blood* 119 (6): 1532-42. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-343475>.

Fujiwara, Tohru. 2017. « Transcriptional regulation of erythropoiesis ». [*Rinsho Ketsueki*] *The Japanese Journal of Clinical Hematology* 58 (6): 643-48. <https://doi.org/10.11406/rinketsu.58.643>.

Fujiwara, Y., C. P. Browne, K. Cunniff, S. C. Goff, et S. H. Orkin. 1996. « Arrested Development of Embryonic Red Cell Precursors in Mouse Embryos Lacking Transcription Factor GATA-1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (22): 12355-58.

Gabbianelli, M., E. Pelosi, E. Montesoro, M. Valtieri, L. Luchetti, P. Samoggia, L. Vitelli, T. Barberi, U. Testa, et S. Lyman. 1995. « Multi-Level Effects of Flt3 Ligand on Human Hematopoiesis: Expansion of Putative Stem Cells and Proliferation of Granulomonocytic Progenitors/Monocytic Precursors ». *Blood* 86 (5): 1661-70.

Gabbianelli, Marco, Ugo Testa, Ornella Morsilli, Elvira Pelosi, Ernestina Saulle, Eleonora Petrucci, Germana Castelli, et al. 2010. « Mechanism of Human Hb Switching: A Possible Role of the Kit Receptor/MiR 221-222 Complex ». *Haematologica* 95 (8): 1253-60. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.018259>.

Galanello, R., S. Barella, L. Maccioni, E. Paglietti, M. A. Melis, M. C. Rosatelli, F. Argioli, et A. Cao. 1989. « Erythropoiesis Following Bone Marrow Transplantation from Donors Heterozygous for Beta-Thalassaemia ». *British Journal of Haematology* 72 (4): 561-66.

Ganz, Tomas. 2018. « Erythropoietic Regulators of Iron Metabolism ». *Free Radical Biology and Medicine*, juillet. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.003>.

Gao, Xiaofei, Hsiang-Ying Lee, Jidefor Ezike, Russell R Elmes, M Inmaculada Barrasa, Patrick Cahan, Hu Li, George Q Daley, et Harvey F Lodish. 2016. « TGF- β Inhibitors Stimulate Red Blood Cell Production by Enhancing Self-Renewal of BFU-E Erythroid Progenitors » 128 (23): 6.

Garcon, L. 2006. « Constitutive Activation of STAT5 and Bcl-XL Overexpression Can Induce Endogenous Erythroid Colony Formation in Human Primary Cells ». *Blood* 108 (5): 1551-54. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-009514>.

- Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad, et K. Ley. 2010. « Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells ». *Science* 327 (5966): 656-61. <https://doi.org/10.1126/science.1178331>.
- Gelsi-Boyer, Véronique, Virginie Trouplin, José Adélaïde, Julien Bonansea, Nathalie Cervera, Nadine Carbuccia, Arnaud Lagarde, et al. 2009. « Mutations of Polycomb-Associated Gene *ASXL1* in Myelodysplastic Syndromes and Chronic Myelomonocytic Leukaemia ». *British Journal of Haematology* 145 (6): 788-800. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07697.x>.
- Georgantas, Robert W., Richard Hildreth, Sebastien Morisot, Jonathan Alder, Chang-gong Liu, Shelly Heimfeld, George A. Calin, Carlo M. Croce, et Curt I. Civin. 2007. « CD34+ Hematopoietic Stem-Progenitor Cell MicroRNA Expression and Function: A Circuit Diagram of Differentiation Control ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (8): 2750-55. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610983104>.
- Glesne, D, et E Huberman. 2006. « Smad6 Is a Protein Kinase X Phosphorylation Substrate and Is Required for HL-60 Cell Differentiation ». *Oncogene* 25 (29): 4086-98. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209436>.
- Goode, Debbie K., Nadine Obier, M.S. Vijayabaskar, Michael Lie-A-Ling, Andrew J. Lilly, Rebecca Hannah, Monika Lichtinger, et al. 2016. « Dynamic Gene Regulatory Networks Drive Hematopoietic Specification and Differentiation ». *Developmental Cell* 36 (5): 572-87. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.01.024>.
- Grass, Jeffrey A., Meghan E. Boyer, Saumen Pal, Jing Wu, Mitchell J. Weiss, et Emery H. Bresnick. 2003. « GATA-1-Dependent Transcriptional Repression of GATA-2 via Disruption of Positive Autoregulation and Domain-Wide Chromatin Remodeling ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (15): 8811-16. <https://doi.org/10.1073/pnas.1432147100>.
- Greenbaum, Adam, Yen-Michael S. Hsu, Ryan B. Day, Laura G. Schuettpelez, Matthew J. Christopher, Joshua N. Borgerding, Takashi Nagasawa, et Daniel C. Link. 2013. « CXCL12 in Early Mesenchymal Progenitors Is Required for Haematopoietic Stem-Cell Maintenance ». *Nature* 495 (7440): 227-30. <https://doi.org/10.1038/nature11926>.

- Gregory, C. J. 1976. « Erythropoietin Sensitivity as a Differentiation Marker in the Hemopoietic System: Studies of Three Erythropoietic Colony Responses in Culture ». *Journal of Cellular Physiology* 89 (2): 289-301. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040890212>.
- Gregory, Connie J, et Alien C Eaves. s. d. « Human Marrow Cells Capable of Erythropoietic Differentiation In Vitro: Definition of Three Erythroid Colony Responses », 11.
- Gu, Tian-Peng, Fan Guo, Hui Yang, Hai-Ping Wu, Gui-Fang Xu, Wei Liu, Zhi-Guo Xie, et al. 2011. « The Role of Tet3 DNA Dioxygenase in Epigenetic Reprogramming by Oocytes ». *Nature* 477 (7366): 606-10. <https://doi.org/10.1038/nature10443>.
- Guiu, Jordi, Ritsuko Shimizu, Teresa D'Altri, Stuart T. Fraser, Jun Hatakeyama, Emery H. Bresnick, Ryoichiro Kageyama, et al. 2013. « Hes Repressors Are Essential Regulators of Hematopoietic Stem Cell Development Downstream of Notch Signaling ». *The Journal of Experimental Medicine* 210 (1): 71-84. <https://doi.org/10.1084/jem.20120993>.
- Haas, Simon, Jenny Hansson, Daniel Klimmeck, Dirk Loeffler, Lars Velten, Hannah Uckelmann, Stephan Wurzer, et al. 2015. « Inflammation-Induced Emergency Megakaryopoiesis Driven by Hematopoietic Stem Cell-like Megakaryocyte Progenitors ». *Cell Stem Cell* 17 (4): 422-34. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.007>.
- Haas, Simon, Andreas Trumpp, et Michael D. Milsom. 2018. « Causes and Consequences of Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity ». *Cell Stem Cell* 22 (5): 627-38. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.003>.
- Han, Gangwen, Allen G. Li, Yao-Yun Liang, Philip Owens, Wei He, Shilong Lu, Yasuhiro Yoshimatsu, et al. 2006. « Smad7-Induced β -Catenin Degradation Alters Epidermal Appendage Development ». *Developmental Cell* 11 (3): 301-12. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.06.014>.
- Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. 2011. « Hallmarks of Cancer: The next Generation ». *Cell* 144 (5): 646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hanspal, M., Y. Smockova, et Q. Uong. 1998. « Molecular Identification and Functional Characterization of a Novel Protein That Mediates the Attachment of Erythroblasts to Macrophages ». *Blood* 92 (8): 2940-50.
- Haseyama, Y., K. i Sawada, A. Oda, K. Koizumi, H. Takano, T. Tarumi, M. Nishio, M. Handa, Y. Ikeda, et T. Koike. 1999. « Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Involved in the

Protection of Primary Cultured Human Erythroid Precursor Cells from Apoptosis ». *Blood* 94 (5): 1568-77.

Hattangadi, S. M., P. Wong, L. Zhang, J. Flygare, et H. F. Lodish. 2011. « From Stem Cell to Red Cell: Regulation of Erythropoiesis at Multiple Levels by Multiple Proteins, RNAs, and Chromatin Modifications ». *Blood* 118 (24): 6258-68. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-356006>.

Hatzfeld, J., M. L. Li, E. L. Brown, H. Sookdeo, J. P. Levesque, T. O'Toole, C. Gurney, S. C. Clark, et A. Hatzfeld. 1991. « Release of Early Human Hematopoietic Progenitors from Quiescence by Antisense Transforming Growth Factor Beta 1 or Rb Oligonucleotides ». *The Journal of Experimental Medicine* 174 (4): 925-29.

He, Wei, David C. Dorn, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Malcolm A.S. Moore, et Joan Massagué. 2006. « Hematopoiesis Controlled by Distinct TIF1 γ and Smad4 Branches of the TGF β Pathway ». *Cell* 125 (5): 929-41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.045>.

Heath, D. S., A. A. Axelrad, D. L. McLeod, et M. M. Shreeve. 1976. « Separation of the Erythropoietin-Responsive Progenitors BFU-E and CFU-E in Mouse Bone Marrow by Unit Gravity Sedimentation ». *Blood* 47 (5): 777-92.

Heo, Hye-Ryeon, Li Chen, Borim An, Kye-Seong Kim, Junfeng Ji, et Seok-Ho Hong. 2015. « Hormonal Regulation of Hematopoietic Stem Cells and Their Niche: A Focus on Estrogen ». *International Journal of Stem Cells* 8 (1): 18-23. <https://doi.org/10.15283/ijsc.2015.8.1.18>.

Hermine, O., J.-B. Arlet, J.-A. Ribeil, F. Guillermin, J. Vandekerckhove, et G. Courtois. 2013. « [HSP70, an erythropoiesis regulator that determines the fate of erythroblasts between death and differentiation] ». *Transfusion Clinique Et Biologique: Journal De La Societe Francaise De Transfusion Sanguine* 20 (2): 144-47. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2013.03.005>.

Hock, Hanno. 2010. « Some Hematopoietic Stem Cells Are More Equal than Others: Figure 1. » *The Journal of Experimental Medicine* 207 (6): 1127-30. <https://doi.org/10.1084/jem.20100950>.

Hodge, Denise, Elise Coghill, Janelle Keys, Tina Maguire, Belinda Hartmann, Alasdair McDowall, Mitchell Weiss, Sean Grimmond, et Andrew Perkins. 2006. « A Global Role for

EKLF in Definitive and Primitive Erythropoiesis ». *Blood* 107 (8): 3359-70.

<https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2888>.

Hresko, Richard C., et Mike Mueckler. 2005. « MTOR.RICTOR Is the Ser473 Kinase for Akt/Protein Kinase B in 3T3-L1 Adipocytes ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (49): 40406-16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508361200>.

Hsu, Yueh-Rong, Gay-May Wu, Elizabeth A. Mendiaz, Rashid Syed, Jette Wypych, Robert Toso, Michael B. Mann, et al. 1997. « The Majority of Stem Cell Factor Exists as Monomer under Physiological Conditions IMPLICATIONS FOR DIMERIZATION MEDIATING BIOLOGICAL ACTIVITY ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (10): 6406-15. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.10.6406>.

Hu, J., J. Liu, F. Xue, G. Halverson, M. Reid, A. Guo, L. Chen, 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): 3246-53. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-476390>.

Huang, L. J., S. N. Constantinescu, et H. F. Lodish. 2001. « The N-Terminal Domain of Janus Kinase 2 Is Required for Golgi Processing and Cell Surface Expression of Erythropoietin Receptor ». *Molecular Cell* 8 (6): 1327-38.

Iavarone, Antonio, Emerson R. King, Xu-Ming Dai, Gustavo Leone, E. Richard Stanley, et Anna Lasorella. 2004. « Retinoblastoma Promotes Definitive Erythropoiesis by Repressing Id2 in Fetal Liver Macrophages ». *Nature* 432 (7020): 1040-45. <https://doi.org/10.1038/nature03068>.

Jackson, H., N. Williams, K. R. Westcott, et R. Green. 1994. « Differential Effects of Transforming Growth Factor-Beta 1 on Distinct Developmental Stages of Murine Megakaryocytopoiesis ». *Journal of Cellular Physiology* 161 (2): 312-18. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041610216>.

Jacobson, Michael D, Miguel Weil, et Martin C Raff. 1997. « Programmed Cell Death in Animal Development ». *Cell* 88 (3): 347-54. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81873-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81873-5).

Jaffredo, T., R. Gautier, A. Eichmann, et F. Dieterlen-Lièvre. 1998. « Intraaortic Hemopoietic Cells Are Derived from Endothelial Cells during Ontogeny ». *Development (Cambridge, England)* 125 (22): 4575-83.

- Jaksits, S., E. Kriehuber, A. S. Charbonnier, K. Rappersberger, G. Stingl, et D. Maurer. 1999. « CD34+ Cell-Derived CD14+ Precursor Cells Develop into Langerhans Cells in a TGF-Beta 1-Dependent Manner ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163 (9): 4869-77.
- James, Chloé, Valérie Ugo, Nicole Casadevall, Stefan N. Constantinescu, et William Vainchenker. 2005. « A JAK2 Mutation in Myeloproliferative Disorders: Pathogenesis and Therapeutic and Scientific Prospects ». *Trends in Molecular Medicine* 11 (12): 546-54. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2005.10.003>.
- Jelkmann, Wolfgang, Julia Bohlius, Michael Hallek, et Arthur J. Sytkowski. 2008. « The Erythropoietin Receptor in Normal and Cancer Tissues ». *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 67 (1): 39-61. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.03.006>.
- Jewell, U. R., I. Kvietikova, A. Scheid, C. Bauer, R. H. Wenger, et M. Gassmann. 2001. « Induction of HIF-1alpha in Response to Hypoxia Is Instantaneous ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (7): 1312-14.
- Ji, Peng. 2015a. « New Insights into the Mechanisms of Mammalian Erythroid Chromatin Condensation and Eucleation ». In *International Review of Cell and Molecular Biology*, 316:159-82. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.01.006>.
- . 2015b. « Chapter Four - New Insights into the Mechanisms of Mammalian Erythroid Chromatin Condensation and Eucleation ». In *International Review of Cell and Molecular Biology*, édité par Kwang W. Jeon, 316:159-82. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.01.006>.
- Ji, Peng, Senthil Raja Jayapal, et Harvey F. Lodish. 2008. « Eucleation of Cultured Mouse Fetal Erythroblasts Requires Rac GTPases and MDia2 ». *Nature Cell Biology* 10 (3): 314-21. <https://doi.org/10.1038/ncb1693>.
- Jiang, Linjia, Xue Han, Jin Wang, Chen Wang, Xiaoqiang Sun, Jiayi Xie, Guojin Wu, et al. 2018. « SHP-1 Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence by Coordinating TGF-β Signaling ». *The Journal of Experimental Medicine* 215 (5): 1337-47. <https://doi.org/10.1084/jem.20171477>.

Johnson, R. A., T. A. Waddelow, J. Caro, A. Oliff, et G. D. Roodman. 1989. « Chronic Exposure to Tumor Necrosis Factor in Vivo Preferentially Inhibits Erythropoiesis in Nude Mice ». *Blood* 74 (1): 130-38.

Kang, Young-Ju, Ji-woong Shin, Jeong-Hwan Yoon, Il-Hwan Oh, Soon-Pyo Lee, Suk-Young Kim, Seok Hee Park, et Mizuko Mamura. 2012. « Inhibition of Erythropoiesis by Smad6 in Human Cord Blood Hematopoietic Stem Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 423 (4): 750-56. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.06.031>.

Karlsson, Göran, Ulrika Blank, Jennifer L. Moody, Mats Ehinger, Sofie Singbrant, Chu-Xia Deng, et Stefan Karlsson. 2007. « Smad4 is critical for self-renewal of hematopoietic stem cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (3): 467-74. <https://doi.org/10.1084/jem.20060465>.

Katoh, Masuko, et Masaru Katoh. 2004. « Identification and Characterization of Human CXXC10 Gene in Silico ». *International Journal of Oncology* 25 (4): 1193-99.

Kaur, Simranpreet, Liza J. Raggatt, Susan M. Millard, Andy C. Wu, Lena Batoon, Rebecca N. Jacobsen, Ingrid G. Winkler, et al. 2018. « Self-Repopulating Recipient Bone Marrow Resident Macrophages Promote Long-Term Hematopoietic Stem Cell Engraftment ». *Blood*, juin, blood-2018-01-829663. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-01-829663>.

Kautz, Léon, Grace Jung, Erika V. Valore, Stefano Rivella, Elizabeta Nemeth, et Tomas Ganz. 2014. « Identification of Erythroferrone as an Erythroid Regulator of Iron Metabolism ». *Nature Genetics* 46 (7): 678-84. <https://doi.org/10.1038/ng.2996>.

Keerthivasan, Ganesan, Hui Liu, Jacob M. Gump, Steven F. Dowdy, Amittha Wickrema, et John D. Crispino. 2012. « A Novel Role for Survivin in Erythroblast Enucleation ». *Haematologica* 97 (10): 1471-79. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.061093>.

Keerthivasan, Ganesan, Sara Small, Hui Liu, Amittha Wickrema, et John D. Crispino. 2010. « Vesicle Trafficking Plays a Novel Role in Erythroblast Enucleation ». *Blood* 116 (17): 3331-40. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-277426>.

Kelley, L L, W F Green, G G Hicks, M C Bondurant, M J Koury, et H E Ruley. 1994. « Apoptosis in Erythroid Progenitors Deprived of Erythropoietin Occurs during the G1 and S Phases of the Cell Cycle without Growth Arrest or Stabilization of Wild-Type P53. » *Molecular and Cellular Biology* 14 (6): 4183-92. <https://doi.org/10.1128/MCB.14.6.4183>.

- Kiel, Mark J., Toshihide Iwashita, Ömer H. Yilmaz, et Sean J. Morrison. 2005. « Spatial Differences in Hematopoiesis but Not in Stem Cells Indicate a Lack of Regional Patterning in Definitive Hematopoietic Stem Cells ». *Developmental Biology* 283 (1): 29-39.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.03.037>.
- Kieran, M. W., A. C. Perkins, S. H. Orkin, et L. I. Zon. 1996. « Thrombopoietin Rescues in Vitro Erythroid Colony Formation from Mouse Embryos Lacking the Erythropoietin Receptor. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (17): 9126-31.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.17.9126>.
- Kim, Do-Hyung, D. D. Sarbassov, Siraj M. Ali, Jessie E. King, Robert R. Latek, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, et David M. Sabatini. 2002. « mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex That Signals to the Cell Growth Machinery ». *Cell* 110 (2): 163-75.
- Kim, H.-Y., S. Choi, J.-H. Yoon, H. J. Lim, H. Lee, J. Choi, E. J. Ro, et al. 2016. « Small Molecule Inhibitors of the Dishevelled-CXXC5 Interaction Are New Drug Candidates for Bone Anabolic Osteoporosis Therapy ». *EMBO Molecular Medicine* 8 (4): 375-87.
<https://doi.org/10.15252/emmm.201505714>.
- Kim, H-Y, J-Y Yoon, J-H Yun, K-W Cho, S-H Lee, Y-M Rhee, H-S Jung, et al. 2015. « CXXC5 is a negative-feedback regulator of the Wnt/ β -catenin pathway involved in osteoblast differentiation ». *Cell Death and Differentiation* 22 (6): 912-20.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2014.238>.
- Kim, Hye-Ryun, Jong-Hee Lee, Hye-Ryeon Heo, Se-Ran Yang, Kwon-Soo Ha, Won Sun Park, Eun-Taek Han, Haengseok Song, et Seok-Ho Hong. 2016. « Improved Hematopoietic Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells via Estrogen Receptor Signaling Pathway ». *Cell & Bioscience* 6 (1): 50. <https://doi.org/10.1186/s13578-016-0111-9>.
- Kim, Kitai, Rui Zhao, Akiko Doi, Kitwa Ng, Juli Unternaehrer, Patrick Cahan, Hongguang Huo, et al. 2011. « Donor Cell Type Can Influence the Epigenome and Differentiation Potential of Human Induced Pluripotent Stem Cells ». *Nature Biotechnology* 29 (12): 1117-19. <https://doi.org/10.1038/nbt.2052>.
- Kim, Mi-Yeon, Hyun-Yi Kim, Jiso Hong, Daesoo Kim, Hyojung Lee, Eunji Cheong, Yangsin Lee, et al. 2016. « CXXC5 Plays a Role as a Transcription Activator for Myelin Genes on

Oligodendrocyte Differentiation: CXXC5 as a Transcription Factor for Myelin Genes ». *Glia* 64 (3): 350-62. <https://doi.org/10.1002/glia.22932>.

Kim, Myoung Shin, Seung Kew Yoon, Frank Bollig, Jirouta Kitagaki, Wonhee Hur, Nathan J. Whye, Yun-Ping Wu, et al. 2010. « A Novel Wilms Tumor 1 (WT1) Target Gene Negatively Regulates the WNT Signaling Pathway ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (19): 14585-93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.094334>.

Knappskog, S., L. M. Myklebust, C. Busch, T. Aloysius, J. E. Varhaug, P. E. Lønning, J. R. Lillehaug, et F. Pendino. 2011. « RINF (CXXC5) Is Overexpressed in Solid Tumors and Is an Unfavorable Prognostic Factor in Breast Cancer ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 22 (10): 2208-15. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq737>.

Ko, Myunggon, Jungeun An, Hozefa S. Bandukwala, Lukas Chavez, Tarmo Äijö, William A. Pastor, Matthew F. Segal, et al. 2013. « Modulation of TET2 Expression and 5-Methylcytosine Oxidation by the CXXC Domain Protein IDAX ». *Nature* 497 (7447): 122-26. <https://doi.org/10.1038/nature12052>.

Kojima, T., T. Shimazui, S. Hinotsu, A. Joraku, T. Oikawa, K. Kawai, R. Horie, et al. 2009. « Decreased Expression of CXXC4 Promotes a Malignant Phenotype in Renal Cell Carcinoma by Activating Wnt Signaling ». *Oncogene* 28 (2): 297-305. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.391>.

Koury, M. J., et M. C. Bondurant. 1988. « Maintenance by Erythropoietin of Viability and Maturation of Murine Erythroid Precursor Cells ». *Journal of Cellular Physiology* 137 (1): 65-74. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041370108>.

Koury, S. T., M. C. Bondurant, M. J. Koury, et G. L. Semenza. 1991. « Localization of Cells Producing Erythropoietin in Murine Liver by in Situ Hybridization ». *Blood* 77 (11): 2497-2503.

Koury, S. T., M. J. Koury, et M. C. Bondurant. 1989. « Cytoskeletal Distribution and Function during the Maturation and Enucleation of Mammalian Erythroblasts ». *The Journal of Cell Biology* 109 (6 Pt 1): 3005-13.

Krystal, G., V. Lam, W. Dragowska, C. Takahashi, J. Appel, A. Gontier, A. Jenkins, H. Lam, L. Quon, et P. Lansdorp. 1994. « Transforming Growth Factor Beta 1 Is an Inducer of Erythroid Differentiation ». *The Journal of Experimental Medicine* 180 (3): 851-60.

Kühnl, A., P. J. M. Valk, M. A. Sanders, A. Ivey, R. K. Hills, K. I. Mills, R. E. Gale, et al. 2015. « Downregulation of the Wnt Inhibitor CXXC5 Predicts a Better Prognosis in Acute Myeloid Leukemia ». *Blood* 125 (19): 2985-94. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-613703>.

Kühnl, Andrea, Peter J. M. Valk, Mathijs A. Sanders, Adam Ivey, Robert K. Hills, Ken I. Mills, Rosemary E. Gale, et al. 2015. « Downregulation of the Wnt Inhibitor CXXC5 Predicts a Better Prognosis in Acute Myeloid Leukemia ». *Blood* 125 (19): 2985-94. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-613703>.

Kuo, M. H., et C. D. Allis. 1998. « Roles of Histone Acetyltransferases and Deacetylases in Gene Regulation ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 20 (8): 615-26. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199808\)20:8<615::AID-BIES4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199808)20:8<615::AID-BIES4>3.0.CO;2-H).

Lacombe, C, J L Da Silva, P Bruneval, J G Fournier, F Wendling, N Casadevall, J P Camilleri, J Bariety, B Varet, et P Tambourin. 1988. « Peritubular Cells Are the Site of Erythropoietin Synthesis in the Murine Hypoxic Kidney. » *Journal of Clinical Investigation* 81 (2): 620-23. <https://doi.org/10.1172/JCI113363>.

Lahn, Michael, Stephan Herberitz, J. Scott Sawyer, Anja J Stauber, Ivelina Gueorguieva, Kyla E Driscoll, Shawn T Estrem, et al. 2015. « Clinical Development of Galunisertib (LY2157299 Monohydrate), a Small Molecule Inhibitor of Transforming Growth Factor-Beta Signaling Pathway ». *Drug Design, Development and Therapy*, août, 4479. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S86621>.

Lam, Jeffrey, Marion van den Bosch, Joanna Wegrzyn, Jeremy Parker, Rawa Ibrahim, Kate Slowski, Linda Chang, et al. 2018. « MiR-143/145 Differentially Regulate Hematopoietic Stem and Progenitor Activity through Suppression of Canonical TGF β Signaling ». *Nature Communications* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04831-3>.

Landry, Josette-Renée, Nicolas Bonadies, Sarah Kinston, Kathy Knezevic, Nicola K. Wilson, S. Helen Oram, Mary Janes, et al. 2009. « Expression of the Leukemia Oncogene Lmo2 Is Controlled by an Array of Tissue-Specific Elements Dispersed over 100 Kb and Bound by

Tal1/Lmo2, Ets, and Gata Factors ». *Blood* 113 (23): 5783-92. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-11-187757>.

Langley, K. E., L. G. Bennett, J. Wypych, S. A. Yancik, X. D. Liu, K. R. Westcott, D. G. Chang, K. A. Smith, et K. M. Zsebo. 1993. « Soluble Stem Cell Factor in Human Serum ». *Blood* 81 (3): 656-60.

Laping, N. J., E. Grygielko, A. Mathur, S. Butter, J. Bomberger, C. Tweed, W. Martin, et al. 2002. « Inhibition of Transforming Growth Factor (TGF)-Beta1-Induced Extracellular Matrix with a Novel Inhibitor of the TGF-Beta Type I Receptor Kinase Activity: SB-431542 ». *Molecular Pharmacology* 62 (1): 58-64.

Lee, Hsiang-Ying, Xiaofei Gao, M. Inmaculada Barrasa, Hu Li, Russell R. Elmes, Luanne L. Peters, et Harvey F. Lodish. 2015. « PPAR- α and Glucocorticoid Receptor Synergize to Promote Erythroid Progenitor Self-Renewal ». *Nature* 522 (7557): 474-77. <https://doi.org/10.1038/nature14326>.

Lee, Inhwan, Sooho Choi, Ji-Hye Yun, Seol hwa Seo, Sehee Choi, Kang-Yell Choi, et Weontae Lee. 2017. « Crystal Structure of the PDZ Domain of Mouse Dishevelled 1 and Its Interaction with CXXC5 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 485 (3): 584-90. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.023>.

Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et V. Ambros. 1993. « The C. Elegans Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to Lin-14 ». *Cell* 75 (5): 843-54.

Lee, Soung-Hoon, Mi-Yeon Kim, Hyun-Yi Kim, Young-Mi Lee, Heesu Kim, Kyoung Ae Nam, Mi Ryung Roh, Do Sik Min, Kee Yang Chung, et Kang-Yell Choi. 2015. « The Dishevelled-Binding Protein CXXC5 Negatively Regulates Cutaneous Wound Healing ». *The Journal of Experimental Medicine* 212 (7): 1061-80. <https://doi.org/10.1084/jem.20141601>.

Lee, Soung-Hoon, Seol Hwa Seo, Dong-Hwan Lee, Long-Quan Pi, Won-Soo Lee, et Kang-Yell Choi. 2017. « Targeting of CXXC5 by a Competing Peptide Stimulates Hair Regrowth and Wound-Induced Hair Neogenesis ». *Journal of Investigative Dermatology* 137 (11): 2260-69. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.04.038>.

Lee-Six, Henry, Nina Friesgaard Øbro, Mairi S. Shepherd, Sebastian Grossmann, Kevin Dawson, Miriam Belmonte, Robert J. Osborne, et al. 2018. « Population Dynamics of Normal

Human Blood Inferred from Somatic Mutations ». *Nature*, septembre, 1.

<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0497-0>.

Lengil, T., D. Gancz, et L. Gilboa. 2015. « Activin Signaling Balances Proliferation and Differentiation of Ovarian Niche Precursors and Enables Adjustment of Niche Numbers ».

Development 142 (5): 883-92. <https://doi.org/10.1242/dev.113902>.

Lenox, Laurie E., John M. Perry, et Robert F. Paulson. 2005. « BMP4 and Madh5 Regulate the Erythroid Response to Acute Anemia ».

Blood 105 (7): 2741-48.
<https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0703>.

Li, J., J. Hale, P. Bhagia, F. Xue, L. Chen, J. Jaffray, H. Yan, et al. 2014. « Isolation and Transcriptome Analyses of Human Erythroid Progenitors: BFU-E and CFU-E ».

Blood 124 (24): 3636-45. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-588806>.

Li, LiQi, Jan Y. Lee, Jennifer Gross, Sang-Hyun Song, Ann Dean, et Paul E. Love. 2010. « A Requirement for Lim Domain Binding Protein 1 in Erythropoiesis ».

The Journal of Experimental Medicine 207 (12): 2543-50. <https://doi.org/10.1084/jem.20100504>.

Lin, C. S., S. K. Lim, V. D'Agati, et F. Costantini. 1996. « Differential Effects of an Erythropoietin Receptor Gene Disruption on Primitive and Definitive Erythropoiesis. »

Genes & Development 10 (2): 154-64. <https://doi.org/10.1101/gad.10.2.154>.

Lindern, M. von, W. Zauner, G. Mellitzer, P. Steinlein, G. Fritsch, K. Huber, B. Löwenberg, et H. Beug. 1999. « The Glucocorticoid Receptor Cooperates with the Erythropoietin Receptor and C-Kit to Enhance and Sustain Proliferation of Erythroid Progenitors in Vitro ».

Blood 94 (2): 550-59.

Ling, Kam-Wing, Katrin Ottersbach, Jan Piet van Hamburg, Aneta Oziemlak, Fong-Ying Tsai, Stuart H. Orkin, Rob Ploemacher, Rudi W. Hendriks, et Elaine Dzierzak. 2004.

« GATA-2 Plays Two Functionally Distinct Roles during the Ontogeny of Hematopoietic Stem Cells ».

The Journal of Experimental Medicine 200 (7): 871-82.
<https://doi.org/10.1084/jem.20031556>.

Liu, Jing, Narla Mohandas, et Xiuli An. 2011. « Membrane Assembly during Erythropoiesis ».

Current Opinion in Hematology 18 (3): 133-38.
<https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32834521f3>.

- Liu, Ying, Ramona Pop, Cameron Sadegh, Carlo Brugnara, Volker H. Haase, et Merav Socolovsky. 2006. « Suppression of Fas-FasL Coexpression by Erythropoietin Mediates Erythroblast Expansion during the Erythropoietic Stress Response in Vivo ». *Blood* 108 (1): 123-33. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-4458>.
- Lodish, Harvey, Johan Flygare, et Song Chou. 2010. « From Stem Cell to Erythroblast: Regulation of Red Cell Production at Multiple Levels by Multiple Hormones ». *IUBMB Life* 62 (7): 492-96. <https://doi.org/10.1002/iub.322>.
- Long, Hannah K., Neil P. Blackledge, et Robert J. Klose. 2013. « ZF-CxxC Domain-Containing Proteins, CpG Islands and the Chromatin Connection ». *Biochemical Society Transactions* 41 (3): 727-40. <https://doi.org/10.1042/BST20130028>.
- Lu, Jun, Shangqin Guo, Benjamin L. Ebert, Hao Zhang, Xiao Peng, Jocelyn Bosco, Jennifer Pretz, et al. 2008. « MicroRNA-Mediated Control of Cell Fate in Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitors ». *Developmental Cell* 14 (6): 843-53. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.03.012>.
- Ma, Shixin, Xiaoling Wan, Zihou Deng, Lei Shi, Congfang Hao, Zhenyuan Zhou, Chun Zhou, et al. 2017. « Epigenetic Regulator CXXC5 Recruits DNA Demethylase Tet2 to Regulate TLR7/9-Elicited IFN Response in PDCs ». *The Journal of Experimental Medicine* 214 (5): 1471-91. <https://doi.org/10.1084/jem.20161149>.
- Ma, Songling, Jiwon Choi, Xuemei Jin, Hyun-Yi Kim, Ji-Hye Yun, Weontae Lee, Kang-Yell Choi, et Kyoung Tai No. 2018. « Discovery of a Small-Molecule Inhibitor of Dvl-CXXC5 Interaction by Computational Approaches ». *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 32 (5): 643-55. <https://doi.org/10.1007/s10822-018-0118-x>.
- Macaulay, Iain C., Valentine Svensson, Charlotte Labalette, Lauren Ferreira, Fiona Hamey, Thierry Voet, Sarah A. Teichmann, et Ana Cvejic. 2016. « Single-Cell RNA-Sequencing Reveals a Continuous Spectrum of Differentiation in Hematopoietic Cells ». *Cell Reports* 14 (4): 966-77. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.082>.
- Macias, Maria J., Pau Martin-Malpartida, et Joan Massagué. 2015. « Structural determinants of SMAD function in TGF- β signaling ». *Trends in biochemical sciences* 40 (6): 296-308. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.03.012>.

- Maeshima, Akito, Masaaki Miya, Keiichiro Mishima, Shin Yamashita, Itaru Kojima, et Yoshihisa Nojima. 2008. « Activin A: Autocrine Regulator of Kidney Development and Repair ». *Endocrine Journal* 55 (1): 1-9.
- Maguer-Satta, Véronique, Laurent Bartholin, Sandrine Jeanpierre, Martine Ffrench, Sylvie Martel, Jean-Pierre Magaud, et Ruth Rimokh. 2003. « Regulation of Human Erythropoiesis by Activin A, BMP2, and BMP4, Members of the TGFbeta Family ». *Experimental Cell Research* 282 (2): 110-20.
- Maherali, Nimet, et Konrad Hochedlinger. 2009. « Tgfbeta Signal Inhibition Cooperates in the Induction of iPSCs and Replaces Sox2 and CMyc ». *Current Biology: CB* 19 (20): 1718-23. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.08.025>.
- Markowitz, S., J. Wang, L. Myeroff, R. Parsons, L. Sun, J. Lutterbaugh, R. S. Fan, E. Zborowska, K. W. Kinzler, et B. Vogelstein. 1995. « Inactivation of the Type II TGF-Beta Receptor in Colon Cancer Cells with Microsatellite Instability ». *Science (New York, N.Y.)* 268 (5215): 1336-38.
- Massagué, Joan, Joan Seoane, et David Wotton. 2005. « Smad Transcription Factors ». *Genes & Development* 19 (23): 2783-2810. <https://doi.org/10.1101/gad.1350705>.
- McGrath, Kathleen E., Jenna M. Frame, et James Palis. 2015. « Early Hematopoiesis and Macrophage Development ». *Seminars in Immunology* 27 (6): 379-87. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.013>.
- McNiece, I. K., K. E. Langley, et K. M. Zsebo. 1991. « Recombinant Human Stem Cell Factor Synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and Epo to Stimulate Human Progenitor Cells of the Myeloid and Erythroid Lineages ». *Experimental Hematology* 19 (3): 226-31.
- Meloche, S, et J Pouysségur. 2007. « The ERK1/2 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway as a Master Regulator of the G1- to S-Phase Transition ». *Oncogene* 26 (22): 3227-39. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210414>.
- Méndez-Ferrer, Simón, Daniel Lucas, Michela Battista, et Paul S. Frenette. 2008. « Haematopoietic Stem Cell Release Is Regulated by Circadian Oscillations ». *Nature* 452 (7186): 442-47. <https://doi.org/10.1038/nature06685>.
- Méndez-Ferrer, Simón, Tatyana V. Michurina, Francesca Ferraro, Amin R. Mazloom, Ben D. MacArthur, Sergio A. Lira, David T. Scadden, Avi Ma'ayan, Grigori N. Enikolopov, et Paul

- S. Frenette. 2010. « Mesenchymal and Haematopoietic Stem Cells Form a Unique Bone Marrow Niche ». *Nature* 466 (7308): 829-34. <https://doi.org/10.1038/nature09262>.
- Miller, I. J., et J. J. Bieker. 1993. « A Novel, Erythroid Cell-Specific Murine Transcription Factor That Binds to the CACCC Element and Is Related to the Krüppel Family of Nuclear Proteins ». *Molecular and Cellular Biology* 13 (5): 2776-86.
- Miller, K. L., J. A. Carlino, Y. Ogawa, P. D. Avis, et K. G. Carroll. 1992. « Alterations in Erythropoiesis in TGF-Beta 1-Treated Mice ». *Experimental Hematology* 20 (8): 951-56.
- Miyagawa, Shin-ichiro, Masao Kobayashi, Nakao Konishi, Takashi Sato, et Kazuhiro Ueda. 2000. « Insulin and Insulin-like Growth Factor I Support the Proliferation of Erythroid Progenitor Cells in Bone Marrow through the Sharing of Receptors ». *British Journal of Haematology* 109 (3): 555-62. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.02047.x>.
- Monteleone, Giovanni, Markus F. Neurath, Sandro Ardizzone, Antonio Di Sabatino, Massimo C. Fantini, Fabiana Castiglione, Maria L. Scribano, et al. 2015. « Mongersen, an Oral SMAD7 Antisense Oligonucleotide, and Crohn's Disease ». *New England Journal of Medicine* 372 (12): 1104-13. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407250>.
- Mucenski, M. L., K. McLain, A. B. Kier, S. H. Swerdlow, C. M. Schreiner, T. A. Miller, D. W. Pietryga, W. J. Scott, et S. S. Potter. 1991. « A Functional C-Myb Gene Is Required for Normal Murine Fetal Hepatic Hematopoiesis ». *Cell* 65 (4): 677-89.
- Mullen, Alan C., David A. Orlando, Jamie J. Newman, Jakob Lovén, Roshan M. Kumar, Steve Bilodeau, Jessica Reddy, Matthew G. Guenther, Rodney P. DeKoter, et Richard A. Young. 2011. « Master Transcription Factors Determine Cell-Type-Specific Responses to TGF- β Signaling ». *Cell* 147 (3): 565-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.050>.
- Murati, A, C Gervais, N Carbuccia, P Finetti, N Cervera, J Adélaïde, S Struski, et al. 2009. « Genome Profiling of Acute Myelomonocytic Leukemia: Alteration of the MYB Locus in MYST3-Linked Cases ». *Leukemia* 23 (1): 85-94. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.257>.
- Murtaugh, L. C., J. H. Chyung, et A. B. Lassar. 1999. « Sonic Hedgehog Promotes Somitic Chondrogenesis by Altering the Cellular Response to BMP Signaling ». *Genes & Development* 13 (2): 225-37.

- Muta, K, S B Krantz, M C Bondurant, et A Wickrema. 1994. « Distinct roles of erythropoietin, insulin-like growth factor I, and stem cell factor in the development of erythroid progenitor cells. » *Journal of Clinical Investigation* 94 (1): 34-43.
- Muta, Koichiro, Sanford B Krantz, Maurice C Bondurant, et Chun-Hua Dai. s. d. « Stem Cell Factor Retards Differentiation of Normal Human Erythroid Progenitor Cells While Stimulating Proliferation », 10.
- Nakada, Daisuke, Hideyuki Oguro, Boaz P. Levi, Nicole Ryan, Ayumi Kitano, Yusuke Saitoh, Makiko Takeichi, George R. Wendt, et Sean J. Morrison. 2014. « Oestrogen Increases Haematopoietic Stem-Cell Self-Renewal in Females and during Pregnancy ». *Nature* 505 (7484): 555-58. <https://doi.org/10.1038/nature12932>.
- Nakahata, T., et N. Okumura. 1994. « Cell Surface Antigen Expression in Human Erythroid Progenitors: Erythroid and Megakaryocytic Markers ». *Leukemia & Lymphoma* 13 (5-6): 401-9. <https://doi.org/10.3109/10428199409049629>.
- Nilson, Douglas G., Denise E. Sabatino, David M. Bodine, et Patrick G. Gallagher. 2006. « Major Erythrocyte Membrane Protein Genes in EKLf-Deficient Mice ». *Experimental Hematology* 34 (6): 705-12. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.02.018>.
- Nishimura, Riko, Kenji Hata, Takuma Matsubara, Makoto Wakabayashi, et Toshiyuki Yoneda. 2012. « Regulation of Bone and Cartilage Development by Network between BMP Signalling and Transcription Factors ». *The Journal of Biochemistry* 151 (3): 247-54. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs004>.
- Nishinakamura, Ryuichi, et Masaji Sakaguchi. 2014. « BMP Signaling and Its Modifiers in Kidney Development ». *Pediatric Nephrology* 29 (4): 681-86. <https://doi.org/10.1007/s00467-013-2671-9>.
- Nocka, K., S. Majumder, B. Chabot, P. Ray, M. Cervone, A. Bernstein, et P. Besmer. 1989. « Expression of C-Kit Gene Products in Known Cellular Targets of W Mutations in Normal and W Mutant Mice--Evidence for an Impaired c-Kit Kinase in Mutant Mice. » *Genes & Development* 3 (6): 816-26. <https://doi.org/10.1101/gad.3.6.816>.
- Notta, F., S. Doulatov, E. Laurenti, A. Poeppl, I. Jurisica, et J. E. Dick. 2011. « Isolation of Single Human Hematopoietic Stem Cells Capable of Long-Term Multilineage Engraftment ». *Science* 333 (6039): 218-21. <https://doi.org/10.1126/science.1201219>.

- Notta, F., S. Zandi, N. Takayama, S. Dobson, O. I. Gan, G. Wilson, K. B. Kaufmann, et al. 2016. « Distinct Routes of Lineage Development Reshape the Human Blood Hierarchy across Ontogeny ». *Science* 351 (6269): aab2116-aab2116. <https://doi.org/10.1126/science.aab2116>.
- Orkin, Stuart H. 2000. « Diversification of Haematopoietic Stem Cells to Specific Lineages ». *Nature Reviews Genetics* 1 (1): 57-64. <https://doi.org/10.1038/35049577>.
- Orkin, Stuart H., et Leonard I. Zon. 2008. « Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology ». *Cell* 132 (4): 631-44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.025>.
- Osawa, M., K.-i. Hanada, H. Hamada, et H. Nakauchi. 1996. « Long-Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low/Negative Hematopoietic Stem Cell ». *Science* 273 (5272): 242-45. <https://doi.org/10.1126/science.273.5272.242>.
- Ostrowski, Daniela, et Ralf Heinrich. 2018. « Alternative Erythropoietin Receptors in the Nervous System ». *Journal of Clinical Medicine* 7 (2): 24. <https://doi.org/10.3390/jcm7020024>.
- Pal, Saumen, Alan B. Cantor, Kirby D. Johnson, Tyler B. Moran, Meghan E. Boyer, Stuart H. Orkin, et Emery H. Bresnick. 2004. « Coregulator-Dependent Facilitation of Chromatin Occupancy by GATA-1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (4): 980-85. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307612100>.
- Palis, J., S. Robertson, M. Kennedy, C. Wall, et G. Keller. 1999. « Development of Erythroid and Myeloid Progenitors in the Yolk Sac and Embryo Proper of the Mouse ». *Development (Cambridge, England)* 126 (22): 5073-84.
- Palis, James. 2014. « Primitive and definitive erythropoiesis in mammals ». *Frontiers in Physiology* 5 (janvier). <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00003>.
- Pater, Emma de, Polynikis Kaimakis, Chris S. Vink, Tomomasa Yokomizo, Tomoko Yamada-Inagawa, Reinier van der Linden, Parham Solaimani Kartalaei, Sally A. Camper, Nancy Speck, et Elaine Dzierzak. 2013. « *Gata2* Is Required for HSC Generation and Survival ». *The Journal of Experimental Medicine* 210 (13): 2843-50. <https://doi.org/10.1084/jem.20130751>.
- Peinado, Héctor, David Olmeda, et Amparo Cano. 2007. « Snail, Zeb and BHLH Factors in Tumour Progression: An Alliance against the Epithelial Phenotype? » *Nature Reviews. Cancer* 7 (6): 415-28. <https://doi.org/10.1038/nrc2131>.

- Pendino, Frédéric, Eric Nguyen, Inge Jonassen, Bjarte Dysvik, Abdulkader Azouz, Michel Lanotte, Evelyne Ségal-Bendirdjian, et Johan R. Lillehaug. 2009. « Functional Involvement of RINF, Retinoid-Inducible Nuclear Factor (CXXC5), in Normal and Tumoral Human Myelopoiesis ». *Blood* 113 (14): 3172-81. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-170035>.
- Peng, Xiyang, Guanming Li, Yuequn Wang, Jian Zhuang, Rong Luo, Jimei Chen, Fa Chen, et al. 2016. « CXXC5 Is Required for Cardiac Looping Relating to TGF β Signaling Pathway in Zebrafish ». *International Journal of Cardiology* 214 (juillet): 246-53. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.03.201>.
- Perry, J. M., O. F. Harandi, P. Porayette, S. Hegde, A. K. Kannan, et R. F. Paulson. 2009. « Maintenance of the BMP4-Dependent Stress Erythropoiesis Pathway in the Murine Spleen Requires Hedgehog Signaling ». *Blood* 113 (4): 911-18. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-147892>.
- Pevny, L., C. S. Lin, V. D'Agati, M. C. Simon, S. H. Orkin, et F. Costantini. 1995. « Development of Hematopoietic Cells Lacking Transcription Factor GATA-1 ». *Development (Cambridge, England)* 121 (1): 163-72.
- Pietras, Eric M., Damien Reynaud, Yoon-A Kang, Daniel Carlin, Fernando J. Calero-Nieto, Andrew D. Leavitt, Joshua M. Stuart, Berthold Göttgens, et Emmanuelle Passegué. 2015. « Functionally distinct subsets of lineage-biased multipotent progenitors control blood production in normal and regenerative conditions ». *Cell stem cell* 17 (1): 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.05.003>.
- Pina, Cristina, Cristina Fugazza, Alex J. Tipping, John Brown, Shamit Soneji, Jose Teles, Carsten Peterson, et Tariq Enver. 2012. « Inferring Rules of Lineage Commitment in Haematopoiesis ». *Nature Cell Biology* 14 (3): 287-94. <https://doi.org/10.1038/ncb2442>.
- Platzbecker, Uwe, Ulrich Germing, Katharina S. Götze, Philipp Kiewe, Karin Mayer, Jörg Chromik, Markus Radsak, et al. 2017. « Luspatercept for the Treatment of Anaemia in Patients with Lower-Risk Myelodysplastic Syndromes (PACE-MDS): A Multicentre, Open-Label Phase 2 Dose-Finding Study with Long-Term Extension Study ». *The Lancet. Oncology* 18 (10): 1338-47. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30615-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30615-0).
- Polakis, Paul. 2000. « Wnt Signaling and Cancer ». *Genes & Development* 14 (15): 1837-51. <https://doi.org/10.1101/gad.14.15.1837>.

- Quere, R., L. Saint-Paul, V. Carmignac, R. Z. Martin, M.-L. Chretien, A. Largeot, A. Hammann, J.-P. Pais de Barros, J.-N. Bastie, et L. Delva. 2014. « Tif1 Regulates the TGF- 1 Receptor and Promotes Physiological Aging of Hematopoietic Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (29): 10592-97. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405546111>.
- Reidy, Kimberly J., et Norman D. Rosenblum. 2009. « Cell and molecular biology of kidney development ». *Seminars in nephrology* 29 (4): 321-37. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2009.03.009>.
- Rhee, Ina, Kurtis E. Bachman, Ben Ho Park, Kam-Wing Jair, Ray-Whay Chiu Yen, Kornel E. Schuebel, Hengmi Cui, et al. 2002. « DNMT1 and DNMT3b Cooperate to Silence Genes in Human Cancer Cells ». *Nature* 416 (6880): 552-56. <https://doi.org/10.1038/416552a>.
- Rinke, J, J P Müller, M F Blaess, A Chase, M Meggendorfer, V Schäfer, N Winkelmann, et al. 2017. « Molecular Characterization of EZH2 Mutant Patients with Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasms ». *Leukemia* 31 (9): 1936-43. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.190>.
- Rizo, Aleksandra, Bert Dontje, Edo Vellenga, Gerald de Haan, et Jan Jacob Schuringa. 2008. « Long-Term Maintenance of Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells by Expression of BMI1 ». *Blood* 111 (5): 2621-30. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-106666>.
- Rönstrand, L. 2004. « Signal Transduction via the Stem Cell Factor Receptor/c-Kit ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 61 (19-20): 2535-48. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4189-6>.
- Rousseau, Guillaume F., Marie-Catherine Giarratana, et Luc Douay. 2014. « Large-Scale Production of Red Blood Cells from Stem Cells: What Are the Technical Challenges Ahead? ». *Biotechnology Journal* 9 (1): 28-38. <https://doi.org/10.1002/biot.201200368>.
- Rowe, R. Grant, Joseph Mandelbaum, Leonard I. Zon, et George Q. Daley. 2016. « Engineering Hematopoietic Stem Cells: Lessons from Development ». *Cell Stem Cell* 18 (6): 707-20. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.05.016>.
- Ruckle, Jon, Mark Jacobs, William Kramer, Amelia E. Pearsall, Ravindra Kumar, Kathryn W. Underwood, Jasbir Seehra, Yijun Yang, Carolyn H. Condon, et Matthew L. Sherman. 2009. « Single-Dose, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of ACE-011 (ActRIIA-

IgG1) in Postmenopausal Women ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 24 (4): 744-52.

<https://doi.org/10.1359/jbmr.081208>.

Rudenko, A., et L.-H. Tsai. 2014. « Epigenetic Regulation in Memory and Cognitive Disorders ». *Neuroscience* 264 (avril): 51-63.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.12.034>.

Rudenko, Andrii, Meelad M. Dawlaty, Jinsoo Seo, Albert W. Cheng, Jia Meng, Thuc Le, Kym F. Faull, Rudolf Jaenisch, et Li-Huei Tsai. 2013. « Tet1 Is Critical for Neuronal Activity-Regulated Gene Expression and Memory Extinction ». *Neuron* 79 (6): 1109-22.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.08.003>.

Rusten, L. S., I. Dybedal, H. K. Blomhoff, R. Blomhoff, E. B. Smeland, et S. E. Jacobsen. 1996. « The RAR-RXR as Well as the RXR-RXR Pathway Is Involved in Signaling Growth Inhibition of Human CD34+ Erythroid Progenitor Cells ». *Blood* 87 (5): 1728-36.

Sanjabi, Shomyseh, Soyoung A. Oh, et Ming O. Li. 2017. « Regulation of the Immune Response by TGF- β : From Conception to Autoimmunity and Infection ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9 (6): a022236. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022236>.

Sankaran, Vijay G., Tobias F. Menne, Danilo Šćepanović, Jo-Anne Vergilio, Peng Ji, Jinkuk Kim, Prathapan Thiru, Stuart H. Orkin, Eric S. Lander, et Harvey F. Lodish. 2011. « MicroRNA-15a and -16-1 Act via MYB to Elevate Fetal Hemoglobin Expression in Human Trisomy 13 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (4): 1519-24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018384108>.

Sankaran, Vijay G., Jian Xu, Tobias Ragozy, Gregory C. Ippolito, Carl R. Walkley, Shanna D. Maika, Yuko Fujiwara, et al. 2009. « Developmental and Species-Divergent Globin Switching Are Driven by BCL11A ». *Nature* 460 (7259): 1093-97.

<https://doi.org/10.1038/nature08243>.

Sawada, K., S. B. Krantz, J. S. Kans, E. N. Dessypris, S. Sawyer, A. D. Glick, et C. I. Civin. 1987. « Purification of Human Erythroid Colony-Forming Units and Demonstration of Specific Binding of Erythropoietin ». *The Journal of Clinical Investigation* 80 (2): 357-66.

<https://doi.org/10.1172/JCI113080>.

- Scandura, Joseph M., Piernicola Boccuni, Joan Massagué, et Stephen D. Nimer. 2004. « Transforming Growth Factor Beta-Induced Cell Cycle Arrest of Human Hematopoietic Cells Requires P57KIP2 up-Regulation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (42): 15231-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406771101>.
- Scheel, Christina, et Robert A. Weinberg. 2011. « Phenotypic Plasticity and Epithelial-Mesenchymal Transitions in Cancer and Normal Stem Cells? » *International Journal of Cancer* 129 (10): 2310-14. <https://doi.org/10.1002/ijc.26311>.
- Schneider, Rebekka K., Monica Schenone, Monica Ventura Ferreira, Rafael Kramann, Cailin E. Joyce, Christina Hartigan, Fabian Beier, et al. 2016. « Rps14 Haploinsufficiency Causes a Block in Erythroid Differentiation Mediated by S100A8 and S100A9 ». *Nature Medicine* 22 (3): 288-97. <https://doi.org/10.1038/nm.4047>.
- Schofield, R. 1978. « The Relationship between the Spleen Colony-Forming Cell and the Haemopoietic Stem Cell ». *Blood Cells* 4 (1-2): 7-25.
- Schürch, Christian M., Carsten Riether, et Adrian F. Ochsenbein. 2014. « Cytotoxic CD8+ T Cells Stimulate Hematopoietic Progenitors by Promoting Cytokine Release from Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells ». *Cell Stem Cell* 14 (4): 460-72. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.01.002>.
- Semenza, G. L., et G. L. Wang. 1992. « A Nuclear Factor Induced by Hypoxia via de Novo Protein Synthesis Binds to the Human Erythropoietin Gene Enhancer at a Site Required for Transcriptional Activation. » *Molecular and Cellular Biology* 12 (12): 5447-54. <https://doi.org/10.1128/MCB.12.12.5447>.
- Shen, Michael M. 2007. « Nodal Signaling: Developmental Roles and Regulation ». *Development* 134 (6): 1023-34. <https://doi.org/10.1242/dev.000166>.
- Sherman, Matthew L., Niels G. Borgstein, Louisa Mook, Dawn Wilson, Yijun Yang, Nianhang Chen, Ravindra Kumar, Kenneth Kim, et Abderrahmane Laadem. 2013. « Multiple-Dose, Safety, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Study of Sotatercept (ActRIIA-IgG1), a Novel Erythropoietic Agent, in Healthy Postmenopausal Women ». *Journal of Clinical Pharmacology* 53 (11): 1121-30. <https://doi.org/10.1002/jcph.160>.

- Shi, Yigong, et Joan Massagué. 2003. « Mechanisms of TGF-Beta Signaling from Cell Membrane to the Nucleus ». *Cell* 113 (6): 685-700.
- Shivdasani, R. A., E. L. Mayer, et S. H. Orkin. 1995. « Absence of Blood Formation in Mice Lacking the T-Cell Leukaemia Oncoprotein Tal-1/SCL ». *Nature* 373 (6513): 432-34. <https://doi.org/10.1038/373432a0>.
- Sing, Garwin K., Jonathan R. Keller, Larry R. Ellingsworth, et Francis W. Ruscetti. 1989. « Transforming Growth Factor-B1 Enhances the Suppression of Human Hematopoiesis by Tumor Necrosis Factor- α or Recombinant Interferon- α ». *Journal of Cellular Biochemistry* 39 (2): 107-15. <https://doi.org/10.1002/jcb.240390203>.
- Smith, L. G., I. L. Weissman, et S. Heimfeld. 1991. « Clonal Analysis of Hematopoietic Stem-Cell Differentiation in Vivo. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (7): 2788-92. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.7.2788>.
- Socolovsky, M., A. E. Fallon, S. Wang, C. Brugnara, et H. F. Lodish. 1999. « Fetal Anemia and Apoptosis of Red Cell Progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} Mice: A Direct Role for Stat5 in Bcl-X(L) Induction ». *Cell* 98 (2): 181-91.
- Socolovsky, Merav. 2007. « Molecular Insights into Stress Erythropoiesis ». *Current Opinion in Hematology* 14 (3): 215-24. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3280de2bf1>.
- . 2013. « Exploring the Erythroblastic Island ». *Nature Medicine* 19 (4): 399-401. <https://doi.org/10.1038/nm.3156>.
- Soma, T., J. M. Yu, et C. E. Dunbar. 1996. « Maintenance of Murine Long-Term Repopulating Stem Cells in Ex Vivo Culture Is Affected by Modulation of Transforming Growth Factor-Beta but Not Macrophage Inflammatory Protein-1 Alpha Activities ». *Blood* 87 (11): 4561-67.
- Song, Su Jung, Keisuke Ito, Ugo Ala, Lev Kats, Kaitlyn Webster, Su Ming Sun, Mojca Jongen-Lavrencic, et al. 2013. « The Oncogenic MicroRNA MiR-22 Targets the TET2 Tumor Suppressor to Promote Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Transformation ». *Cell Stem Cell* 13 (1): 87-101. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.06.003>.
- Steinhart, Zachary, et Stephane Angers. 2018. « Wnt Signaling in Development and Tissue Homeostasis ». *Development* 145 (11): dev146589. <https://doi.org/10.1242/dev.146589>.

Stoddart, A., Z. Qian, A. A. Fernald, R. J. Bergerson, J. Wang, T. Karrison, J. Anastasi, et al. 2016. « Retroviral Insertional Mutagenesis Identifies the Del(5q) Genes, CXXC5, TIFAB and ETF1, as Well as the Wnt Pathway, as Potential Targets in Del(5q) Myeloid Neoplasms ». *Haematologica* 101 (6): e232-36. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.139527>.

Sugiyama, Tatsuki, Hiroshi Kohara, Mamiko Noda, et Takashi Nagasawa. 2006. « Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches ». *Immunity* 25 (6): 977-88. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.016>.

Sui, Weiguo, Zhoufang Shi, Wen Xue, Minglin Ou, Ying Zhu, Jiejing Chen, Hua Lin, Fuhua Liu, et Yong Dai. 2017. « Circular RNA and Gene Expression Profiles in Gastric Cancer Based on Microarray Chip Technology ». *Oncology Reports* 37 (3): 1804-14. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5415>.

Sui, Zhenhua, Roberta B. Nowak, Andrea Bacconi, Nancy E. Kim, Hui Liu, Jie Li, Amittha Wickrema, Xiu-li An, et Velia M. Fowler. 2014. « Tropomodulin3-Null Mice Are Embryonic Lethal with Anemia Due to Impaired Erythroid Terminal Differentiation in the Fetal Liver ». *Blood* 123 (5): 758-67. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-492710>.

Sun, Deqiang, Min Luo, Mira Jeong, Benjamin Rodriguez, Zheng Xia, Rebecca Hannah, Hui Wang, et al. 2014. « Epigenomic Profiling of Young and Aged HSCs Reveals Concerted Changes during Aging That Reinforce Self-Renewal ». *Cell Stem Cell* 14 (5): 673-88. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.03.002>.

Sun, Zhiwei, Ye Wang, Xu Han, Xielan Zhao, Yuanliang Peng, Yusheng Li, Minyuan Peng, et al. 2015. « MiR-150 Inhibits Terminal Erythroid Proliferation and Differentiation ». *Oncotarget* 6 (40): 43033-47. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5824>.

Suragani, Rajasekhar N V S, Samuel M Cadena, Sharon M Cawley, Dianne Sako, Dianne Mitchell, Robert Li, Monique V Davies, et al. 2014. « Transforming Growth Factor- β Superfamily Ligand Trap ACE-536 Corrects Anemia by Promoting Late-Stage Erythropoiesis ». *Nature Medicine* 20 (4): 408-14. <https://doi.org/10.1038/nm.3512>.

Suzuki, Mikiko, Maki Kobayashi-Osaki, Shuichi Tsutsumi, Xiaoqing Pan, Shin'ya Ohmori, Jun Takai, Takashi Moriguchi, et al. 2013. « GATA Factor Switching from GATA2 to GATA1 Contributes to Erythroid Differentiation ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 18 (11): 921-33. <https://doi.org/10.1111/gtc.12086>.

Swaminathan, Aishwarya, Daniel Hidalgo, Hien Nguyen, Scott Shaffer, Maria Figueroa, Jian Xu, et Merav Socolovsky. 2017. « Acute Deletion of Tet2 or Tet3 Transiently Dysregulate Murine Erythropoiesis ». *Blood* 130 (Suppl 1): 11-11.

Tahiliani, Mamta, Kian Peng Koh, Yinghua Shen, William A. Pastor, Hozefa Bandukwala, Yevgeny Brudno, Suneet Agarwal, et al. 2009. « Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1 ». *Science (New York, N.Y.)* 324 (5929): 930-35. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>.

Takahashi, Kazutoshi, et Shinya Yamanaka. 2006. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors ». *Cell* 126 (4): 663-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.

Takahashi, S., K. Onodera, H. Motohashi, N. Suwabe, N. Hayashi, N. Yanai, Y. Nabesima, et M. Yamamoto. 1997. « Arrest in Primitive Erythroid Cell Development Caused by Promoter-Specific Disruption of the GATA-1 Gene ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (19): 12611-15.

Tan, Sheng, Hua Li, Weijie Zhang, Yunying Shao, Yuan Liu, Haiyang Guan, Jun Wu, et al. 2018. « NUDT21 Negatively Regulates PSMB2 and CXXC5 by Alternative Polyadenylation and Contributes to Hepatocellular Carcinoma Suppression ». *Oncogene*, mai. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0280-6>.

Tanaka, Yuji, Kengo Okamoto, Kwesi Teye, Toshiyuki Umata, Noriyuki Yamagiwa, Yutaka Suto, Yi Zhang, et Makoto Tsuneoka. 2010. « JmjC Enzyme KDM2A Is a Regulator of RRNA Transcription in Response to Starvation ». *The EMBO Journal* 29 (9): 1510-22. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.56>.

Terszowski, G. 2005. « Prospective Isolation and Global Gene Expression Analysis of the Erythrocyte Colony-Forming Unit (CFU-E) ». *Blood* 105 (5): 1937-45. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3459>.

Thiery, Jean Paul, Hervé Acloque, Ruby Y. J. Huang, et M. Angela Nieto. 2009. « Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease ». *Cell* 139 (5): 871-90. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>.

- Thomson, John P., Peter J. Skene, Jim Selfridge, Thomas Clouaire, Jacky Guy, Shaun Webb, Alastair R. W. Kerr, et al. 2010. « CpG Islands Influence Chromatin Structure via the CpG-Binding Protein Cfp1 ». *Nature* 464 (7291): 1082-86. <https://doi.org/10.1038/nature08924>.
- Thul, Peter J., Lovisa Åkesson, Mikaela Wiking, Diana Mahdessian, Aikaterini Geladaki, Hammou Ait Blal, Tove Alm, et al. 2017. « A Subcellular Map of the Human Proteome ». *Science* 356 (6340): eaal3321. <https://doi.org/10.1126/science.aal3321>.
- Till, J. E., et E. A. McCULLOCH. 1961. « A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells ». *Radiation Research* 14 (février): 213-22.
- Tober, Joanna, Kathleen E. McGrath, et James Palis. 2008. « Primitive Erythropoiesis and Megakaryopoiesis in the Yolk Sac Are Independent of C-Myb ». *Blood* 111 (5): 2636-39. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-124685>.
- Tojo, M., A. Takebe, S. Takahashi, K. Tanaka, T. Imamura, K. Miyazono, et T. Chiba. 2012. « Smad7-Deficient Mice Show Growth Retardation with Reduced Viability ». *Journal of Biochemistry* 151 (6): 621-31. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs022>.
- Tornack, Julia, Yohei Kawano, Natalio Garbi, Günter J. Hämmerling, Fritz Melchers, et Motokazu Tsuneto. 2017. « Flt3 ligand-eGFP-reporter expression characterizes functionally distinct subpopulations of CD150+ long-term repopulating murine hematopoietic stem cells ». *European Journal of Immunology* 47 (9): 1477-87. <https://doi.org/10.1002/eji.201646730>.
- Treppendahl, Marianne B., Lars Möllgård, Eva Hellström-Lindberg, Paul Cloos, et Kirsten Grønbaek. 2013. « Downregulation but Lack of Promoter Hypermethylation or Somatic Mutations of the Potential Tumor Suppressor CXXC5 in MDS and AML with Deletion 5q ». *European Journal of Haematology* 90 (3): 259-60. <https://doi.org/10.1111/ejh.12045>.
- Trompouki, Eirini, Teresa V. Bowman, Lee N. Lawton, Zi Peng Fan, Dai-Chen Wu, Anthony DiBiase, Corey S. Martin, et al. 2011. « Lineage Regulators Direct BMP and Wnt Pathways to Cell-Specific Programs during Differentiation and Regeneration ». *Cell* 147 (3): 577-89. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.044>.
- Tsai, F. Y., G. Keller, F. C. Kuo, M. Weiss, J. Chen, M. Rosenblatt, F. W. Alt, et S. H. Orkin. 1994. « An Early Haematopoietic Defect in Mice Lacking the Transcription Factor GATA-2 ». *Nature* 371 (6494): 221-26. <https://doi.org/10.1038/371221a0>.

- Tsang, A. P., Y. Fujiwara, D. B. Hom, et S. H. Orkin. 1998. « Failure of Megakaryopoiesis and Arrested Erythropoiesis in Mice Lacking the GATA-1 Transcriptional Cofactor FOG ». *Genes & Development* 12 (8): 1176-88.
- Tsukazaki, T., T. A. Chiang, A. F. Davison, L. Attisano, et J. L. Wrana. 1998. « SARA, a FYVE Domain Protein That Recruits Smad2 to the TGFbeta Receptor ». *Cell* 95 (6): 779-91.
- Tusi, Betsabeh Khoramian, Samuel L. Wolock, Caleb Weinreb, Yung Hwang, Daniel Hidalgo, Rapolas Zilionis, Ari Waisman, Jun R. Huh, Allon M. Klein, et Merav Socolovsky. 2018. « Population Snapshots Predict Early Haematopoietic and Erythroid Hierarchies ». *Nature* 555 (7694): 54-60. <https://doi.org/10.1038/nature25741>.
- Uhlén, Mathias, Erik Björling, Charlotta Agaton, Cristina Al-Khalili Szigyarto, Bahram Amini, Elisabet Andersen, Ann-Catrin Andersson, et al. 2005. « A Human Protein Atlas for Normal and Cancer Tissues Based on Antibody Proteomics ». *Molecular & Cellular Proteomics* 4 (12): 1920-32. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500279-MCP200>.
- Uoshima, N., M. Ozawa, S. Kimura, K. Tanaka, K. Wada, Y. Kobayashi, et M. Kondo. 1995. « Changes in C-Kit Expression and Effects of SCF during Differentiation of Human Erythroid Progenitor Cells ». *British Journal of Haematology* 91 (1): 30-36.
- Vannucchi, A. M., A. Grossi, D. Rafanelli, M. Statello, S. Cinotti, et P. Rossi-Ferrini. 1994. « Inhibition of Erythropoietin Production in Vitro by Human Interferon Gamma ». *British Journal of Haematology* 87 (1): 18-23.
- Vasilatou, Diamantina, Sotirios Papageorgiou, Vassiliki Pappa, Efstathios Papageorgiou, et John Dervenoulas. 2010. « The Role of MicroRNAs in Normal and Malignant Hematopoiesis: MicroRNAs in Hematological Malignancies ». *European Journal of Haematology* 84 (1): 1-16. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2009.01348.x>.
- Verdier, F., S. Chrétien, C. Billat, S. Gisselbrecht, C. Lacombe, et P. Mayeux. 1997. « Erythropoietin Induces the Tyrosine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-2. An Alternate Pathway for Erythropoietin-Induced Phosphatidylinositol 3-Kinase Activation ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (42): 26173-78.
- Wagers, A. J. 2002. « Little Evidence for Developmental Plasticity of Adult Hematopoietic Stem Cells ». *Science* 297 (5590): 2256-59. <https://doi.org/10.1126/science.1074807>.

Wang, G. L., et G. L. Semenza. 1996. « Molecular Basis of Hypoxia-Induced Erythropoietin Expression ». *Current Opinion in Hematology* 3 (2): 156-62.

Wang, Jieyu, Yoshihiro Hayashi, Asumi Yokota, Zefeng Xu, Yue Zhang, Rui Huang, Xiaomei Yan, et al. 2018. « Expansion of EPOR-Negative Macrophages besides Erythroblasts by Elevated EPOR Signaling in Erythrocytosis Mouse Models ». *Haematologica* 103 (1): 40-50. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.172775>.

Wang, Q., T. Stacy, M. Binder, M. Marin-Padilla, A. H. Sharpe, et N. A. Speck. 1996. « Disruption of the Cbfa2 Gene Causes Necrosis and Hemorrhaging in the Central Nervous System and Blocks Definitive Hematopoiesis. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (8): 3444-49. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3444>.

Wang, Xiaofang, Fang Dong, Sen Zhang, Wanzhu Yang, Wenying Yu, Zhao Wang, Shanshan Zhang, et al. 2018. « TGF-B1 Negatively Regulates the Number and Function of Hematopoietic Stem Cells ». *Stem Cell Reports* 11 (1): 274-87. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.05.017>.

Warren, A. J., W. H. Colledge, M. B. Carlton, M. J. Evans, A. J. Smith, et T. H. Rabbitts. 1994. « The Oncogenic Cysteine-Rich LIM Domain Protein Rbtl2 Is Essential for Erythroid Development ». *Cell* 78 (1): 45-57.

Wickenhauser, C., J. Lorenzen, J. Thiele, A. Hillienhof, K. Jungheim, B. Schmitz, M. L. Hansmann, et R. Fischer. 1995. « Secretion of Cytokines (Interleukins-1 Alpha, -3, and -6 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) by Normal Human Bone Marrow Megakaryocytes ». *Blood* 85 (3): 685-91.

Wilson, Anne, Elisa Laurenti, Gabriela Oser, Richard C. van der Wath, William Blanco-Bose, Maïke Jaworski, Sandra Offner, et al. 2008. « Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair ». *Cell* 135 (6): 1118-29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.048>.

Wilson, N. K., D. Miranda-Saavedra, S. Kinston, N. Bonadies, S. D. Foster, F. Calero-Nieto, M. A. Dawson, et al. 2009. « The Transcriptional Program Controlled by the Stem Cell Leukemia Gene Scl/Tal1 during Early Embryonic Hematopoietic Development ». *Blood* 113 (22): 5456-65. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-200048>.

- Wilson, Nicola K., Samuel D. Foster, Xiaonan Wang, Kathy Knezevic, Judith Schütte, Polynikis Kaimakis, Paulina M. Chilarska, et al. 2010. « Combinatorial Transcriptional Control In Blood Stem/Progenitor Cells: Genome-Wide Analysis of Ten Major Transcriptional Regulators ». *Cell Stem Cell* 7 (4): 532-44. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.016>.
- Winter, Johan P. de, et Hans Joenje. 2009. « The Genetic and Molecular Basis of Fanconi Anemia ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 668 (1-2): 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.11.004>.
- Wu, H., U. Klingmüller, P. Besmer, et H. F. Lodish. 1995. « Interaction of the Erythropoietin and Stem-Cell-Factor Receptors ». *Nature* 377 (6546): 242-46. <https://doi.org/10.1038/377242a0>.
- Wu, H., X. Liu, R. Jaenisch, et H. F. Lodish. 1995. « Generation of Committed Erythroid BFU-E and CFU-E Progenitors Does Not Require Erythropoietin or the Erythropoietin Receptor ». *Cell* 83 (1): 59-67.
- Wu, Hao, Xiaoji Wu, Li Shen, et Yi Zhang. 2014. « Single-Base Resolution Analysis of Active DNA Demethylation Using Methylase-Assisted Bisulfite Sequencing ». *Nature Biotechnology* 32 (12): 1231-40. <https://doi.org/10.1038/nbt.3073>.
- Wu, Xiaoji, et Yi Zhang. 2017. « TET-Mediated Active DNA Demethylation: Mechanism, Function and Beyond ». *Nature Reviews Genetics* 18 (9): 517-34. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33>.
- Xi, Qiaoran, Zhanxin Wang, Alexia-Ileana Zaromytidou, Xiang H.-F. Zhang, Lai-Fong Chow-Tsang, Jing X. Liu, Hyesoo Kim, et al. 2011. « A Poised Chromatin Platform for TGF- β Access to Master Regulators ». *Cell* 147 (7): 1511-24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.032>.
- Xiang, J., D.-C. Wu, Y. Chen, et R. F. Paulson. 2015. « In Vitro Culture of Stress Erythroid Progenitors Identifies Distinct Progenitor Populations and Analogous Human Progenitors ». *Blood* 125 (11): 1803-12. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-591453>.
- Xie, Yinliang, Hao Bai, Yanfeng Liu, Dixie L. Hoyle, Tao Cheng, et Zack Z. Wang. 2015. « Cooperative Effect of Erythropoietin and TGF- β Inhibition on Erythroid Development in Human Pluripotent Stem Cells: TGF-B ETA E FFECT ON E RYTHROID D

DIFFERENTIATION IN HPSCs ». *Journal of Cellular Biochemistry* 116 (12): 2735-43.
<https://doi.org/10.1002/jcb.25233>.

Xu, Chao, Ke Liu, Ming Lei, Ally Yang, Yanjun Li, Timothy R. Hughes, et Jinrong Min. 2018. « DNA Sequence Recognition of Human CXXC Domains and Their Structural Determinants ». *Structure (London, England: 1993)* 26 (1): 85-95.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2017.11.022>.

Yamaguchi, Shinpei, Li Shen, Yuting Liu, Damian Sandler, et Yi Zhang. 2013. « Role of Tet1 in Erasure of Genomic Imprinting ». *Nature* 504 (7480): 460-64.
<https://doi.org/10.1038/nature12805>.

Yamamoto, Ryo, Yohei Morita, Jun Ooehara, Sanae Hamanaka, Masafumi Onodera, Karl Lenhard Rudolph, Hideo Ema, et Hiromitsu Nakauchi. 2013. « Clonal Analysis Unveils Self-Renewing Lineage-Restricted Progenitors Generated Directly from Hematopoietic Stem Cells ». *Cell* 154 (5): 1112-26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.007>.

Yan, Hongxia, John Hale, Julie Jaffray, Jie Li, Yaomei Wang, Yumin Huang, Xiuli An, et al. 2018. « Developmental Differences between Neonatal and Adult Human Erythropoiesis ». *American Journal of Hematology* 93 (4): 494-503. <https://doi.org/10.1002/ajh.25015>.

Yan, Hongxia, Yaomei Wang, Xiaoli Qu, Jie Li, John Hale, Yumin Huang, Chao An, et al. 2017. « Distinct Roles for TET Family Proteins in Regulating Human Erythropoiesis ». *Blood* 129 (14): 2002-12. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-736587>.

Yan, Xiaohua, Hongwei Liao, Minzhang Cheng, Xiaojing Shi, Xia Lin, Xin-Hua Feng, et Ye-Guang Chen. 2016. « Smad7 Protein Interacts with Receptor-Regulated Smads (R-Smads) to Inhibit Transforming Growth Factor- β (TGF- β)/Smad Signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (1): 382-92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.694281>.

Yan, Xiaohua, Jingyi Wu, Quanlong Jiang, Hao Cheng, Jing-Dong J Han, et Ye-Guang Chen. 2018. « CXXC5 Suppresses Hepatocellular Carcinoma by Promoting TGF- β -Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis ». *Journal of Molecular Cell Biology* 10 (1): 48-59.
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjx042>.

Yang, L. 2005. « Identification of Lin-Sca1+kit+CD34+Flt3- Short-Term Hematopoietic Stem Cells Capable of Rapidly Reconstituting and Rescuing Myeloablated Transplant Recipients ». *Blood* 105 (7): 2717-23. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2159>.

- Yaşar, Pelin, Gamze Ayaz, et Mesut Muyan. 2016. « Estradiol-Estrogen Receptor α Mediates the Expression of the CXXC5 Gene through the Estrogen Response Element-Dependent Signaling Pathway ». *Scientific Reports* 6 (1). <https://doi.org/10.1038/srep37808>.
- Yi, Zanhua, Orit Cohen-Barak, Nobuko Hagiwara, Paul D. Kingsley, Deborah A. Fuchs, Drew T. Erickson, Elliot M. Epner, James Palis, et Murray H. Brilliant. 2006. « Sox6 Directly Silences Epsilon Globin Expression in Definitive Erythropoiesis ». *PLoS Genetics* 2 (2): e14. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020014>.
- Ying, Qi-Long, Jennifer Nichols, Ian Chambers, et Austin Smith. 2003. « BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3 ». *Cell* 115 (3): 281-92. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00847-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00847-X).
- Yoder, Mervin C. 2014. « Inducing Definitive Hematopoiesis in a Dish ». *Nature Biotechnology* 32 (6): 539-41. <https://doi.org/10.1038/nbt.2929>.
- Young, Julia C., Shoichi Wakitani, et Kate L. Loveland. 2015. « TGF- β superfamily signaling in testis formation and early male germline development ». *Seminars in Cell & Developmental Biology, Plasma membrane repair & Development and pathology of the gonad*, 45 (septembre): 94-103. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.029>.
- Yu, Qi-Hong, Shu-Ye Wang, et Zhanhe Wu. 2014. « Advances in Genetic Studies of Inherited Bone Marrow Failure Syndromes and Their Associated Malignancies ». *Translational Pediatrics* 3 (4): 5.
- Zermati, Y., C. Garrido, S. Amsellem, S. Fishelson, D. Bouscary, F. Valensi, B. Varet, E. Solary, et O. Hermine. 2001. « Caspase Activation Is Required for Terminal Erythroid Differentiation ». *The Journal of Experimental Medicine* 193 (2): 247-54.
- Zermati, Yael, Serge Fichelson, Françoise Valensi, Jean Marc Freyssinier, Philippe Rouyer-Fessard, Elizabeth Cramer, Josette Guichard, Bruno Varet, et Olivier Hermine. 2000. « Transforming Growth Factor Inhibits Erythropoiesis by Blocking Proliferation and Accelerating Differentiation of Erythroid Progenitors ». *Experimental Hematology* 28 (8): 885-94. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(00\)00488-4](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(00)00488-4).
- Zhang, Jing, Merav Socolovsky, Alec W. Gross, et Harvey F. Lodish. 2003. « Role of Ras Signaling in Erythroid Differentiation of Mouse Fetal Liver Cells: Functional Analysis by a

Flow Cytometry-Based Novel Culture System ». *Blood* 102 (12): 3938-46.

<https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1479>.

Zhang, Lingbo, Lina Prak, Violeta Rayon-Estrada, Prathapan Thiru, Johan Flygare, Bing Lim, et Harvey F. Lodish. 2013. « ZFP36L2 Is Required for Self-Renewal of Early Burst-Forming Unit Erythroid Progenitors ». *Nature* 499 (7456): 92-96. <https://doi.org/10.1038/nature12215>.

Zhang, Min, RuiPeng Wang, YanYi Wang, FeiCi Diao, Fei Lu, Dong Gao, DanYing Chen, ZhongHe Zhai, et HongBing Shu. 2009a. « The CXXC Finger 5 Protein Is Required for DNA Damage-Induced P53 Activation ». *Science in China Series C: Life Sciences* 52 (6): 528-38. <https://doi.org/10.1007/s11427-009-0083-7>.

———. 2009b. « The CXXC Finger 5 Protein Is Required for DNA Damage-Induced P53 Activation ». *Science in China Series C: Life Sciences* 52 (6): 528-38. <https://doi.org/10.1007/s11427-009-0083-7>.

Zhang, Y., Y. Y. Zhang, M. Ogata, P. Chen, A. Harada, S. Hashimoto, et K. Matsushima. 1999. « Transforming Growth Factor-Beta1 Polarizes Murine Hematopoietic Progenitor Cells to Generate Langerhans Cell-like Dendritic Cells through a Monocyte/Macrophage Differentiation Pathway ». *Blood* 93 (4): 1208-20.

Zhao, Ming, Lopa Mishra, et Chu-Xia Deng. 2018. « The Role of TGF- β /SMAD4 Signaling in Cancer ». *International Journal of Biological Sciences* 14 (2): 111-23. <https://doi.org/10.7150/ijbs.23230>.

Zhou, L., C. McMahon, T. Bhagat, C. Alencar, Y. Yu, M. Fazzari, D. Sohal, et al. 2011. « Reduced SMAD7 Leads to Overactivation of TGF- Signaling in MDS That Can Be Reversed by a Specific Inhibitor of TGF- Receptor I Kinase ». *Cancer Research* 71 (3): 955-63. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2933>.

Zhou, Zhuo, Xingguo Li, Changwang Deng, Paul A. Ney, Suming Huang, et Jörg Bungert. 2010. « USF and NF-E2 Cooperate to Regulate the Recruitment and Activity of RNA Polymerase II in the Beta-Globin Gene Locus ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (21): 15894-905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.098376>.

Zivot, Andrea, Jeffrey M. Lipton, Anupama Narla, et Lionel Blanc. 2018. « Erythropoiesis: Insights into Pathophysiology and Treatments in 2017 ». *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 24 (1): 11. <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0011-z>.

Zon, L. I., H. Youssoufian, C. Mather, H. F. Lodish, et S. H. Orkin. 1991. « Activation of the Erythropoietin Receptor Promoter by Transcription Factor GATA-1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (23): 10638-41.