



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I

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

par **Christine GRIGORAKAKI**

**ETUDE DES MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE
L'INHIBITION DE L'ERYTHROPOÏÈSE PAR LA CYTOKINE PRO-
INFLAMMATOIRE TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF)- α**

Le 14 novembre 2011

Membres du jury :

Rapporteurs :

Mme Iris BEHRMANN Professeur, Université de Luxembourg, Luxembourg
M. François MORLE Docteur, CNRS Université Claude Bernard, Lyon 1, France

Examineurs :

Mme Christine CHOMIENNE Professeur, IUH Université Paris Diderot, Paris 7, France
M. Pierre JEANNESSON Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne, France
M. Athanase VISVIKIS Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy 1, France
M. Mario DICATO Professeur, Centre Hospitalier de Luxembourg, Luxembourg
M. Franck MORCEAU Docteur, LBMCC, Luxembourg
M. Marc DIEDERICH Docteur, LBMCC, Luxembourg

*à mes parents,
à ma sœur,
à Matthieu*

Δεν υπάρχει τίποτε αδύνατο γι' αυτόν που θα προσπαθήσει.

Μέγας Αλέξανδρος, 356-323 π.Χ.

Rien n'est impossible à celui qui a la volonté d'essayer.

Alexandre le Grand, 356-323 av. J-C.

Dans ces quelques lignes je tiens à remercier et à faire honneur à toutes les personnes qui ont contribué directement ou indirectement, de près ou de loin à ce travail.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) au Luxembourg. J'ai bénéficié pendant la durée de ma thèse d'une bourse du Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Luxembourgeois (Bourse Aide à la Formation Recherche). Sans cette aide financière, ce travail n'aurait pas pu aboutir. J'exprime toute ma reconnaissance au Pr Dicato pour m'avoir permis de travailler sous un contrat de la fondation « Recherche Cancer et Sang » dont il est le président.

Je tiens en premier lieu à remercier le Dr Marc Diederich de m'avoir offert l'opportunité d'effectuer ma thèse au sein du laboratoire LBMCC qu'il fait vivre avec tant d'énergie. Je le remercie également pour ses conseils scientifiques dispensés tout au long de ces trois années, ainsi que pour ses encouragements et ses suggestions.

Je souhaite remercier vivement le Dr Franck Morceau pour m'avoir accueillie et fait connaître le monde, en principe bien organisé, des facteurs de transcription hématopoïétiques. Les longues discussions pédagogiques et instructives que l'on a pu avoir m'ont permis d'évoluer et de beaucoup apprendre dans ce domaine. Je lui suis également très reconnaissante pour sa patience, ainsi que pour ses commentaires avisés portés à mon travail. Qu'il trouve toute ma gratitude avec l'accomplissement de cette thèse.

Je remercie le Pr Christine Chomienne, le Pr Pierre Jeannesson, le Pr Athanase Visvikis et le Pr Mario Dicato qui m'ont fait l'honneur de participer au jury de soutenance et j'adresse toute ma gratitude au Pr Iris Behrmann et au Dr François Morlé pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Vos remarques, vos conseils, vos critiques seront la dernière pierre apportée à ce travail.

Je remercie le personnel de la Maternité (Clinique Dr Bohler) pour sa collaboration tout au long de ces années. Je ne saurais remercier toutes les femmes et couples anonymes qui ont accepté de faire don de leur sang de cordon. Sans cette matière première mon travail n'aurait pas pu être réalisé.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du laboratoire, ceux que j'ai juste croisés, ceux que j'ai l'impression d'avoir toujours connus et les « petits derniers », pour tous les moments scientifiques ou non que l'on a pu partager: Anne, Carole, Florian, Barbora, François, Noémie, Tommy, Cyril, Fanny, Estelle, Jenny, Tom, Serge, Claudia, Flavia, Cristina, Cindy, Michael, Sébastien, Elodie, Marie-Hélène, Stephania, Mareike, Marc, Karoline, Anthoula et Fabienne.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude et mon amour à mes parents qui ont toujours su me donner espoir et confiance en moi, ainsi que pour tout le soutien qu'ils ont su m'apporter. Leurs encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que j'ai pu accomplir. Qu'ils trouvent avec l'aboutissement de ce travail un modeste geste de reconnaissance et de remerciement.

Merci à ma sœur Mickaëla qui, malgré la distance qui nous sépare depuis plusieurs années, a su me soutenir moralement durant nos longues conversations téléphoniques. Je l'en remercie du fond du cœur. Qu'elle sache que même si des kilomètres nous séparent je serais toujours présente pour elle.

Enfin, je tiens à remercier Matthieu. Nos chemins se sont croisés en France, puis se sont séparés pour finalement se souder en Grèce un beau jour de mai. Je l'ai rejoint au Luxembourg où le soleil fait défaut, mais ce n'est somme toute pas si grave puisqu'il illumine chaque moment de ma vie passé à ses côtés. Je le remercie pour sa patience, son soutien permanent et les discussions toujours fascinantes qui me font voyager dans l'espace auprès de ses satellites.

Ce travail n'aurait pu aboutir sans le soutien financier

*du Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Luxembourgeois (Bourse Aide à la Formation Recherche: TR-PHD-BFR08-048)*

de la fondation «Recherche Cancer et Sang»

de l'association «Recherches Scientifiques Luxembourg»

du «Télévie»

et

de l'association «Een Häerz fir Kriibskrank Kanner»

Publications liées à cette thèse *

Travail original :

Biochem Pharmacol. 2011 Jul 15;82(2):156-66. Epub 2011 Apr 9

Tumor necrosis factor alpha-mediated inhibition of erythropoiesis involves GATA-1/GATA-2 balance impairment and PU.1 over-expression

Grigorakaki C, Morceau F, Chateauvieux S, Dicato M, Diederich M

PMID: 21501595

Revue :

Biochem Pharmacol. 2009 May 15;77(10):1572-9. Epub 2009 Jan 6.

Linking anemia to inflammation and cancer: the crucial role of TNFalpha.

Buck I, Morceau F, **Grigorakaki C**, Dicato M, Diederich M.

PMID: 19174153

Autres publications *

Travail original :

Biochem Pharmacol. 2011 Feb 15;81(4):498-509. Epub 2010 Nov 23

Valproic acid perturbs hematopoietic homeostasis by inhibition of erythroid differentiation and activation of the myelo-monocytic pathway

Chateauvieux S, Eifes S, Morceau F, **Grigorakaki C**, Schnekenburger M, Henry E, Dicato M, Diederich M

PMID: 21108933

Revue :

Biochem Pharmacol. 2011 Nov 15;82(10):1291-303. Epub 2011 Jul 7

Erythropoietin, Erythropoiesis and beyond

Chateauvieux S, **Grigorakaki C**, Morceau F, Dicato M, Diederich M

PMID : 21782802

* *Ces publications sont annexées à la fin du document.*

RESUME

Les anémies liées au cancer affectent la qualité de vie des patients ainsi que leur pronostic vital. Elles sont suspectées d'être régulées par la libération d'une cytokine pro-inflammatoire, le « tumor necrosis factor » (TNF)- α . Le TNF α a été décrit comme un inhibiteur potentiel de la production de l'érythropoïétine (Epo) au niveau du rein, conduisant à une diminution de l'érythropoïèse. Cependant des études *in vitro* ont suggéré que le TNF α pouvait agir directement sur les cellules érythroblastiques pour inhiber leur différenciation.

Des études réalisées au laboratoire LBMCC sur des lignées cellulaires établies ont montré que le TNF α limite la surexpression de gènes érythroïde-spécifiques dans les lignées érythroleucémiques humaines K562 et HEL. Ces résultats ont été également démontrés dans la lignée TF1 qui est dépendante de l'Epo pour sa différenciation érythroïde. Dans tous les cas, l'effet négatif du TNF α a été corrélé à l'inhibition du facteur de transcription GATA-1, une protéine-clé de la différenciation érythroïde.

Afin d'étudier l'effet inhibiteur du TNF α sur l'induction de l'érythropoïèse par l'Epo, nous avons utilisé des cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34+ comme modèle, obtenues à partir de sang de cordon ombilical. Dans notre système de culture *in vitro*, nous avons pu reproduire les différents stades de l'érythropoïèse en présence d'Epo, permettant ainsi d'étudier l'effet du TNF α sur cette voie de différenciation. L'étude de la production d'hémoglobine, de la morphologie cellulaire par coloration au May-Grünwald Giemsa et par l'analyse des marqueurs membranaires spécifiques en cytométrie en flux, a montré que le TNF α réduit la capacité de l'Epo à engager les CSH vers une différenciation érythroïde terminale. Au niveau moléculaire, nous avons corrélé cet effet à la réduction de l'expression de gènes érythroïde-spécifiques comme les gènes de globines par PCR en temps réel et western blot. Le TNF α réduit l'activité trans-activatrice du facteur de transcription GATA-1 et induit son interaction avec le facteur PU.1 *via* l'activation de la protéine p38MAPK comme le montrent des expériences d'immunoprécipitation. D'autre part, l'expression du facteur GATA-2, qui régule négativement l'érythropoïèse et qui favorise la prolifération des CSH, est aussi induite. De plus, l'inhibition des micro-ARN 144 et 451 par le TNF α est en corrélation avec la perturbation de la balance GATA-1/GATA-2.

Mots-clés : TNF α , inflammation, anémie, cancer, différenciation

ABSTRACT

Cancer-related anemia affects patients' quality of life and survival. It is thought to be mediated by the release of tumor necrosis factor (TNF α). TNF α is one of the major mediators of inflammation and has been linked to the inhibition of the erythropoietin (Epo) production from kidney, leading thus to anemia. However, the inhibitory effect of TNF α on erythroblast differentiation has been suggested by several *in vitro* studies.

Previous results from the LBMCC lab on leukemia cell lines showed that TNF α prevents aclacynomycin-induced over-expression of erythroid-specific genes in human erythroleukemia cell lines including K562 and HEL. These results have been confirmed in the Epo-dependent TF1 cell line. In all cases, the inhibitory effect of TNF α was in correlation with the regulation of the erythroid key transcription factor, GATA-1.

In order to study the inhibitory effect of TNF α on the Epo-mediated erythropoiesis, we used CD34+ hematopoietic stem cells (HSC) gained from cord blood as a model. In our *in vitro* model, we reproduced different stages of erythropoiesis, allowing us to use this model for the study of TNF α and the erythroid lineage. The study of hemoglobin production, the cell morphology (May-Grünwald Giemsa) and the analysis of specific markers (flow cytometry), have shown the limited capacity of Epo to stimulate HSC erythroid differentiation. At the molecular level, we have correlated this effect to the reduced expression of erythroid-specific genes (globins and Epo receptor) by western blot and real time PCR analysis. TNF α reduces the transcriptional activity of GATA-1 and induces its interaction with PU.1 *via* p38MAPK activation (Protein immunoprecipitation). Furthermore, GATA-2 expression, which negatively regulates erythropoiesis and promotes HSC proliferation and self-renewal, is also increased. Moreover, the inhibition of miRs 144 and 451 is in correlation with the GATA-1/GATA-2 balance perturbation.

Keywords: TNF α , inflammation, anemia, cancer, differentiation

SOMMAIRE

1	INTRODUCTION.....	1
1.1	Anémie et cancer.....	1
1.2	La cytokine Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α).....	6
1.2.1	TNF α , inflammation et cancer.....	7
1.2.2	TNF α et anémie.....	8
1.3	L'hématopoïèse.....	13
1.4	Plasticité et reprogrammation des cellules souches hématopoïétiques.....	17
1.5	L'érythropoïèse.....	21
1.5.1	Les modifications cellulaires au cours de l'érythropoïèse.....	21
1.5.2	L'hémoglobine.....	24
1.5.3	L'îlot érythroblastique.....	24
1.5.4	L'érythropoïétine.....	27
1.5.5	Voies de signalisation induites par l'Epo.....	29
1.5.6	La survie et la mort des érythrocytes.....	31
1.6	Le facteur de transcription GATA-1.....	34
1.6.1	Rôles de GATA-1.....	34
	GATA-1 et la différenciation.....	34
	GATA-1 et la survie cellulaire.....	39
1.6.2	Régulation de l'expression de GATA-1.....	39
	Au niveau transcriptionnel.....	39
	Au niveau traductionnel.....	40
1.6.3	Régulation de l'activité de GATA-1.....	41
	Modifications post-traductionnelles.....	41
	Interaction de GATA-1 avec d'autres protéines.....	44
1.6.4	Rôle de l'interaction entre GATA-1 et PU.1 dans l'hématopoïèse.....	46
1.6.5	La balance GATA-1/GATA-2.....	50
1.6.6	Les micro-ARN.....	52
2	OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	55
2.1	Objectif général.....	55
2.2	Objectifs spécifiques.....	55
3	MATERIELS ET METHODES.....	57
3.1	Isolement et enrichissement des cellules CD34+ et GPA+.....	57
3.2	Culture cellulaire.....	57
	Cellules souches progénitrices hématopoïétiques (CD34+).....	57
	Lignées cellulaires établies.....	60

3.3	Coloration de May-Grünwald Giemsa	61
3.4	Test à la Benzidine	61
3.5	Cytométrie en flux.....	62
3.6	Microscopie à fluorescence.....	64
3.7	Extraction des protéines totales.....	64
3.8	Extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques	64
3.9	Western blot	65
3.10	Immunoprécipitation protéique	68
3.11	Retard de migration sur gel ou gel retard.....	68
3.12	Extraction des ARN totaux	70
3.13	Transcription inverse et PCR en temps réel.....	70
3.14	Transfections de plasmides à expression transitoire	72
3.15	Analyse des miR	72
3.16	Analyses statistiques	73
4	RESULTATS.....	74
4.1	Isolement des cellules CD34+ et caractérisation du modèle.....	74
4.1.1	Enrichissement en cellules CD34+ et phénotypage des populations cellulaires en culture	74
4.1.2	Efficacité du milieu différenciant	79
4.1.3	Capacité de réponse des cellules CD34+ au TNF α	79
4.2	Influence du TNF α sur la survie des CSH en milieu différenciant.....	82
4.2.1	Effet sur la prolifération cellulaire.....	82
4.2.2	Effet sur l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose.....	82
4.2.3	Effet sur la voie JAK2/STAT5	83
4.3	Effet du TNF α sur l'érythropoïèse au niveau cellulaire.....	88
4.3.1	Effet sur la production de l'hémoglobine	88
4.3.2	Profile phénotypique des CSH après traitement au TNF α	90
4.3.3	Impact du TNF α sur différentes voies de différenciation hématopoïétique	94
4.4	Effet du TNF α sur l'érythropoïèse au niveau moléculaire.....	98
4.4.1	Effet sur l'expression de gènes érythroïdes spécifiques	98
4.4.2	Effet sur l'activité transcriptionnelle de GATA-1	100
4.4.3	Effet sur l'expression des facteurs de transcription hématopoïétiques : GATA-1, GATA-2, PU.1	102
4.4.4	Effet sur l'interaction GATA-1/PU.1	108

4.4.5	Expression des gènes spécifiques de la voie érythroïde dans des cellules érythroïdes GPA+ différenciées en présence du TNF α	110
4.4.6	Effet du TNF α sur des cellules engagées dans la voie de différenciation érythroïde ..	110
4.5	Implication de la p38MAPK dans l'effet inhibiteur du TNF α	115
4.5.1	Corrélation entre l'activation de p38MAPK et l'hémoglobinisation des CSH.....	115
4.5.2	Effet d'un inhibiteur de p38MAPK sur l'expression de REpo	115
4.5.3	Effet de l'inhibition de p38MAPK sur l'interaction GATA-1/PU.1	116
4.6	Effet du TNF α sur les miR régulant la balance GATA-1/GATA-2.....	120
5	DISCUSSION	123
5.1	Choix du modèle	123
5.2	TNF α et différenciation.....	125
5.3	TNF α , prolifération et survie des CSH	130
6	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	132
	BIBLIOGRAPHIE	134

Table des figures

Figure 1 : Voies de signalisation activées par le TNF α	10
Figure 2 : TNF α et progression tumorale	11
Figure 3 : TNF α et anémie liée au cancer.....	12
Figure 4 : L'hématopoïèse et les cytokines	15
Figure 5: Les facteurs de transcription au cours de l'hématopoïèse.....	16
Figure 6: La plasticité cellulaire des cellules souches	19
Figure 7: La reprogrammation des CSH.....	20
Figure 8 : L'érythropoïèse	22
Figure 9 : Expression de récepteurs et d'autres protéines membranaires au cours de l'érythropoïèse ..	23
Figure 10 : Ilot érythroblastique	26
Figure 11 : Régulation de l'érythropoïèse	28
Figure 12 : Voies de signalisation activées par l'interaction entre l'Epo et son récepteur (REpo).....	33
Figure 13: Modifications post-traductionnelles et mutations héréditaires de GATA-1	43
Figure 14 : Interaction entre GATA-1 et PU.1	49
Figure 15 : Modèle de la régulation dynamique de GATA-1 et GATA-2 pendant l'érythropoïèse	51
Figure 16 : Conditions de culture et de différenciation de CD34+.....	59
Figure 17 : Pureté en cellules CD34+ après enrichissement	76
Figure 18 : Pureté de la culture en cellules souches progénitrices hématopoïétiques (CSH).....	77
Figure 19 : Caractérisation de la population cellulaire avant stimulation/traitement.....	78
Figure 20 : Efficacité du milieu différenciant.....	80
Figure 21 : Capacité de réponse au TNF α des cellules CD34+ en culture	81
Figure 22 : Effet du TNF α sur la prolifération des CSH en milieu différenciant.....	84
Figure 23 : Effet du TNF α sur l'expression de gènes régulateurs du cycle cellulaire et de l'apoptose .	85
Figure 24 : Effet du TNF α sur la voie JAK2/STAT5	86
Figure 25 : Effet du TNF α sur le taux de cellules synthétisant de l'hémoglobine	89
Figure 26 : Effet du TNF α sur la morphologie cellulaire en cours de différenciation	91
Figure 27 : Effet du TNF α sur les marqueurs de différenciation hématopoïétiques	92
Figure 28 : Effet du TNF α sur l'expression de la GPA.....	93
Figure 29 : Effet du TNF α sur différentes voies hématopoïétiques	95
Figure 30 : Evolution du marqueur CD34 au cours du temps de culture	96
Figure 31 : Effet du TNF α sur l'expression des gènes érythroïdes: globines et REpo.....	99
Figure 32: Effet du TNF α sur l'activité transcriptionnelle de GATA-1	101
Figure 33: Effet du TNF α sur l'expression des gènes des facteurs de transcription : GATA-1, GATA-2 et PU.1	104
Figure 34 : Effet du TNF α sur l'expression protéique du facteur de transcription: GATA-1	105

Figure 35: Effet du TNF α sur l'expression protéique des facteurs de transcription GATA-2 et PU.1	106
Figure 36 : Effet du TNF α dans un le milieu différenciant 2	107
Figure 37: Evaluation de l'interaction GATA-1/PU.1	109
Figure 38 : Expression des gènes de globines et des facteurs de transcription dans des cellules différenciées en présence de TNF α	112
Figure 39 : Effet du TNF α sur des cellules érythroblastiques	113
Figure 40: Implication de p38MAPK	117
Figure 41 : p38MAPK contribue à la formation du complexe GATA-1/PU.1 induit par le TNF α	118
Figure 42 : Effet du TNF α sur l'expression des miR 144-451	121

Tables des tableaux

Tableau 1: Mutations des séquences consensus de GATA-1 dans ses gènes cibles	37
Tableau 2 : Mutations de GATA-1 et liaison GATA1/FOG1	38
Tableau 3 : Liste des miR impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse	54
Tableau 4: Anticorps utilisés pour la cytométrie en flux	63
Tableau 5: Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les western blots	66
Tableau 6: Séquences utilisées pour la fabrication du kit RT ² Profiler PCR Array System	71

ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique Complémentaire
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messagé
ATP	Adénosine tri-phosphate
Bcl-2	B cell lymphoma 2
Bcl-xL	B cell lymphoma- extra large
BCR-ABL	Break cluster region-Abelson
BFU-E	Burst Forming Units - Erythroïde
BSA	Bovin Serum Albumin
c-IAP2	Inhibitor of apoptosis
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CBP	CREB-binding protein
CD	Cluster de différenciation
CERA	Continuous Erythropoietin Receptor Activator
CFU-Baso	Colony forming units-Basophile
CFU-E	Colony forming units-Erythroïde
CFU-Eo	Colony forming units-Eosinophile
CFU-GM	Colony forming units-Granulaire/Mégacaryocytaire
CFU-MK	Colony forming units-Mégacaryocytaire
COX2	Cyclooxygénase 2
CPL	Cellule Progénitrice Lymphoïde
CPM	Cellule Progénitrice Myéloïde
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
DT	Domaine de Transactivation
DTT	Dithiothréitol
DZC	Doigt de Zinc C-terminal
DZN	Doigt de Zinc N-terminal
E.Baso.	Erythroblaste basophile
E.Ortho.	Erythroblaste orthochromatophile
E.Poly.	Erythroblaste polychromatophile
EDTA	Ethylènediamintetraacétate
Egr2	Early growth response-2
EGTA	Acide éthylèneglycoltétracétique
EKLF	Erythroid Kruppel-like Factor
Epo	Erythropoïétine
ERAF	Erythroid-associated factor
Eryth.	Erythrocyte
ESA	Erythropoiesis-Stimulating Agent
FDA	Food and Drug Administration
FOG	Friend of GATA
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GATA-1s	GATA-1 short
Gfi	Growth factor independent

GM-CSF	Granulomonocyte-colony stimulating factor
GPA	Glycophorine A
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
Hb	Hémoglobine
HEPES	Hydroxyethyl-piperazine-ethane sulfonic acid
HIF	Hypoxia-inducible factor
HLA	Human Leukocyte Antigen
HMBS	Hydroxyméthylbilane synthase
HOXA	Homeobox A cluster
HPFH	Hereditary persistence of fetal hemoglobin
Hsp	Heat shock protein
IFN	Interféron
IgG	Immunoglobuline G
I κ B	inhibiteur de κ B
IKK	I κ B kinase
IL	Interleukine
ITG	Intégrine
JAK	Janus kinase
KO	Knock Out
LAM	Leucémie aiguë myéloblastique
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
LMKA	Leucémie mégacaryoblastique aiguë
Lmo2	Lim only protein 2
M-CSF	Monocyte-colony stimulating factor
MACS	Magnetic cell sorting
MafB	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MGG	May-Grünwald Giemsa
MCH	Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin Concentration
MCV	Mean corpuscular volume
miR	Micro-ARN
MMP	Métalloprotéase 9
MPER	Mammalian Protein Extraction Reagent
MRPS14	Protéine mitochondriale ribosomale S14
Nab2	NGFIA-binding protein 2
NESP	Novel erythropoiesis stimulating protein
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B
NFE2	Nuclear Factor Erythroid 2
NFI-A	Nuclear factor 1 A
NK	Natural Killer
NT	Non Traduite
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PGM	Progéniteur Granulocyte-Monocyte
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase

PME	Progéniteur Mégacaryo-Erythroïde
PMSF	Phényl méthyl sulfonyl fluoride
Pol	Polymérase
PRCA	Pur Red Cell Aplasia
pré-miR	Précurseur de miR
pri-miR	miR primaire
Pro-E.	Proérythroblaste
PVDF	Polyvinylidene fluoride
REpo	Récepteur à l'Epo
Rét.	Réticulocyte
RhEpo	Erythropoïétine recombinante humaine
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
Runx1	Runt-related transcription factor
SCF	Stem Cell Factor
SCL	Stem Cell Leukemia
SEP	Synthetic Erythropoiesis Protein
SH2	Src Homology 2
SMT	Syndrome myéloprolifératif transitoire
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SVF	Sérum de veau fœtal
T. amb.	Température ambiante
Tal1	T-cell acute lymphoblastique leukemia 1
TBE	Tris borate EDTA
TCR-CD3	Récepteur CD3 de cellule-T
TFRC	Récepteur de la transferrine
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TNFR	Récepteur au TNF
TPO	Thrombopoïétine
TRAIL	TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIH	Virus d'immunodéficience humaine

1 INTRODUCTION

1.1 Anémie et cancer

L'érythrocytose et l'anémie sont des pathologies liées à la perturbation du nombre de globules rouges dans le sang. En état d'érythrocytose ou polyglobulie, les patients présentent une augmentation de globules rouges et/ou d'hémoglobine (Hb). À l'inverse, l'anémie est caractérisée par le manque de globules rouges dans le sang et une diminution de la concentration intra-érythrocytaire en hémoglobine. Le diagnostic d'une anémie repose sur la concentration en Hb. Les valeurs physiologiques pour les adultes sont de 13,5 à 18 g/dL chez l'homme et de 11,5 à 16,4 g/dL chez la femme. Des valeurs inférieures au minimum permettent de diagnostiquer une anémie. L'appréciation de toute anémie, préalable à la recherche étiologique, exige la vérification d'autres données hématologiques. La valeur du contenu hémoglobinique des hématies (MCH pour Mean corpuscular Hb ou MCHC pour Mean corpuscular Hb concentration) et de la taille des hématies (MCV pour mean corpuscular volume) sont des données qui complètent le diagnostic. Les anémies peuvent être classifiées selon des données quantitatives et qualitatives des globules rouges mais aussi selon les taux d'érythropoïétine (Epo) (Hodges *et al.* 2007).

L'anémie est un symptôme courant chez les patients atteints de maladies chroniques telles que les inflammations chroniques et les cancers. Une anémie associée au cancer existe chez plus de 30% des patients (Mercadante *et al.* 2000). Plusieurs études ont démontré que l'anémie diminue le taux de survie d'environ 65% selon le type de cancer, le stade et l'âge des patients. L'anémie peut ainsi être considérée comme un facteur pronostic négatif pour la progression de la maladie et l'index de survie (Caro *et al.* 2001).

Les symptômes décrits par les patients anémiques sont communs à plusieurs types d'anémie et affectent leur qualité de vie. Ces symptômes sont une pâleur du teint, une fatigue inexplicée, une perte d'énergie ainsi que des états de somnolence et des maux de tête. Dans des cas d'anémie plus sévère, des étourdissements ainsi qu'une accélération inhabituelle du rythme cardiaque et une respiration courte apparaissent au cours d'exercices de faible intensité.

L'anémie associée au cancer peut avoir diverses causes. Elle peut être liée à l'état de santé initiale du patient (hémoglobinopathies, thalassémies, problèmes intestinaux), à la maladie (infiltration de progéniteurs immatures de la moelle osseuse vers la circulation sanguine, résection intestinale, hypersplénisme) ou à la thérapie (toxicité au niveau des reins et de la moelle osseuse suite à une chimiothérapie) (Dicato 2003; Spivak 2005). L'anémie peut

apparaître après une chimiothérapie myélosuppressive (Groopman *et al.* 1999). Elle peut également s'aggraver à la suite d'une radiothérapie indépendamment des tumeurs en diminuant l'efficacité de la thérapie (Knight *et al.* 2004). Des variations moléculaires des différents facteurs jouant un rôle dans l'hématopoïèse et l'érythropoïèse peuvent perturber la production des globules rouges, et par conséquent nuire au transport de l'oxygène dans le sang. L'anémie survient habituellement après une augmentation anormale du taux de cytokines pro-inflammatoires comme le tumor necrosis factor- α (TNF α), l'interleukine (IL)-1, l'IL6 et l'interféron- γ (IFN γ) (Kurzrock 2001).

Jusque dans les années 1980 le seul traitement contre les anémies était la transfusion sanguine. En effet, les patients anémiques, avec des taux d'Hb inférieurs à 10 g/dL, étaient traités par des transfusions à répétition jusqu'à atteindre un niveau d'hémoglobine satisfaisant. Cependant, ce traitement présente un risque d'infection, peut provoquer une sensibilisation aux antigènes d'histocompatibilité HLA (Human Leukocyte Antigen ; cause de rejet des greffes) et une surcharge en fer (Macdougall *et al.* 2005). De plus, les transfusions sanguines sont devenues plus risquées avec l'apparition du VIH (virus d'immunodéficience humaine). Dans les années 1980, afin de traiter les patients anémiques en raison d'un déficit en Epo, une thérapie alternative est apparue avec la synthèse de molécules d'Epo recombinante humaine (RhEpo) permettant la correction du niveau d'Hb en imitant l'action de l'Epo sur les progéniteurs érythroïdes.

Le gène de l'érythropoïétine a été cloné dans les années 1980 et la technologie de l'ADN recombinant a permis la production d'Epo de synthèse appelés ESAs (Erythropoiesis-stimulating agents) ou RhEpo en grande quantité. La technique de fabrication consiste à introduire le gène de l'Epo humain dans une lignée cellulaire animale, qui produit la protéine appelée recombinante et qui peut ensuite être isolée (Jacobs *et al.* 1985; Lin *et al.* 1985). Ces molécules sont capables de corriger l'anémie dans 90% des cas. Le reste des patients n'arrive pas à atteindre des taux d'hémoglobine satisfaisants ou le traitement peut perdre de son efficacité. Cette diminution de réponse au traitement est due aux inflammations chroniques, aux infections, à la déficience en fer, à la perte chronique de sang et à la production d'anticorps contre les RhEpo provoquant ainsi une aplasie des globules rouge ou PRCA (pure red cell aplasia) (Drueke 2001; Casadevall *et al.* 2002; Macdougall *et al.* 2002; Macdougall *et al.* 2005). Le traitement par des RhEpo est seulement symptomatique et utilisé chez des patients anémiques avec de faibles taux d'Epo (cancer, inflammation et insuffisance rénale) (Maxwell 2002; Glaspy *et al.* 2006; Mann *et al.* 2007). Dans d'autres cas, les patients anémiques sont

traités avec les transfusions sanguines, avec l'administration nutritionnelle de stéroïdes ou plus drastiquement en réalisant des splénectomies ou des transplantations de la moelle osseuse.

Différentes RhEpo sont produites. La première à avoir été commercialisée est un polypeptide non modifié de l'Epo endogène native, connue sous le nom d'Epoétine. Son principal inconvénient est sa demi-vie qui n'est que de six heures. Elle doit être administrée régulièrement (plusieurs fois par semaine) par injection sous-cutanée ou intraveineuse pour être efficace.

Des modifications ont été apportées au polypeptide synthétique de l'Epo afin de prolonger sa demi-vie tout en restant efficace et de diminuer la fréquence des injections. La NESP (novel erythropoiesis stimulating protein) aussi connue sous le nom de Darbépoétine alpha diffère de l'époétine par la substitution de cinq acides aminés permettant l'assemblage de cinq chaînes glycosylées au lieu de trois. Elle a une demi-vie plus élevée *in vivo* et une affinité supérieure pour le récepteur Epo (Repo). En pratique, l'utilisation de la NESP ne nécessite qu'une injection hebdomadaire (voire moins) en comparaison de l'Epoétine (Egrie *et al.* 2001). Une autre stratégie utilisée pour augmenter la demi-vie des RhEpo est la liaison de différents types de polymères sur la chaîne polypeptidique. La molécule SEP (synthetic erythropoiesis protein) est un polypeptide entièrement synthétique greffé de polymères chargés négativement. Sa demi-vie est 2,5 fois plus élevée que celle de l'Epoétine (Kochendoerfer *et al.* 2003).

La pégylation est une technique utilisée pour augmenter la durée d'efficacité en diminuant la cinétique d'élimination d'une molécule par augmentation de son poids moléculaire. Plus précisément, cette technique consiste à fixer du polyéthylène glycol sur la séquence peptidique. L'Epo pégylée appelée CERA (continuous erythropoietin receptor activator) a une demi-vie remarquablement élevée. En effet, 135 heures sont nécessaires pour que le CERA soit éliminé de la circulation après injection sous-cutanée ou intraveineuse (Macdougall 2005). D'autres techniques ont été utilisées pour augmenter le poids moléculaire de l'Epo comme sa dimérisation *via* un peptide flexible ou *via* la fixation de groupements sulfhydryles (Sytkowski *et al.* 1998; Sytkowski *et al.* 1999). L'utilisation des RhEpo peut donc améliorer la qualité de vie des patients souffrant d'une anémie en diminuant parallèlement la fréquence de transfusions (Littlewood *et al.* 2001).

L'HematideTM est un oligopeptide synthétique de 20 acides aminés (GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG) sélectionné après plusieurs tests d'oligopeptides pour identifier ceux à affinité élevée pour le REpo. Sa séquence peptidique n'a aucune homologie avec celle de l'Epo native mais il est capable d'en imiter la fonction (Fan *et al.* 2006). C'est un médicament très prometteur aux avantages variés. La production des peptides synthétiques est

moins onéreuse que celle des protéines recombinantes. De plus, la forme pégylée de l'HematideTM nécessite une administration moins fréquente que les RhEpo couramment commercialisés puisque sa nature non protéique lui confère une plus grande stabilité et il peut également être stocké à température ambiante. En parallèle, l'HematideTM n'induit pas de réaction immunologique contrairement aux RhEpo dans certains cas de PRCA (pure red cell aplasia) où les patients produisent des anticorps. Une étude menée dans un modèle de rats produisant des anticorps anti-Epo et présentant une PRCA, montre que l'HematideTM induit la stimulation des progéniteurs érythroïdes sans provoquer de réaction immunitaire (Woodburn *et al.* 2007). Des résultats encourageants obtenus *in vitro* et *in vivo* par des études en Phase II ont permis l'entrée de l'HematideTM en phase III d'essais cliniques (Stead *et al.* 2006; Locatelli *et al.* 2009; Macdougall *et al.* 2009).

En 2003, des essais cliniques ont été menés dans le but de prouver le rôle bénéfique du traitement à la RhEpo, sur des patients cancéreux souffrant d'une anémie. Les résultats de ces études ont montré que l'Epo avait l'effet escompté sur l'anémie. En revanche, ils ont aussi montré une augmentation de la mortalité chez les patients traités à la RhEpo par rapport aux personnes non traitées. Deux autres études ont montré que les patients traités à l'Epo présentaient des problèmes cardiovasculaires avec des incidents thromboemboliques (effets secondaires connus du traitement à l'Epo). Cette augmentation de la mortalité était la conséquence d'une progression accélérée des tumeurs (Henke *et al.* 2003; Leyland-Jones *et al.* 2005). La validité de ces deux études a été critiquée et elles ont été controversées par plusieurs équipes (Glaspy 2005; Agarwal *et al.* 2007; Osterborg *et al.* 2007; Fandrey 2008). Pourtant en 2007, une autre étude clinique de phase III a été prématurément arrêtée à cause de l'augmentation de la mortalité due à la prolifération tumorale rapide chez les patients traités à l'Epo (Wright *et al.* 2007). Au contraire, l'administration de RhEpo à des individus sains n'altère pas leurs indices physiologiques et peut être utilisée comme contrôle pendant les essais cliniques (Lundby *et al.* 2011).

À ce jour deux hypothèses sont émises pour interpréter la capacité de l'Epo à stimuler la progression tumorale. La première a démontré la présence de récepteurs à l'Epo sur plusieurs types de cancers différents (Osterborg *et al.* 2007). La deuxième suggère que l'interaction Epo/REpo active des voies de signalisation capables d'induire l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse ou des gènes de facteurs qui eux-mêmes induisent la progression tumorale (Yasuda *et al.* 2003). Il est cependant important de noter que les patients avec des taux d'IFN γ , de TNF α , d'IL6, d'IL10 et d'IL13 sont plus ou moins sensibles ou résistants au traitement à l'Epo (Lacombe 1996; Cooper *et al.* 2003).

Le traitement des patients cancéreux anémiques avec la RhEpo se poursuit, mais en parallèle de nouveaux essais cliniques de phase III sont organisés aux Etats Unis sur recommandation de la FDA (Food and Drug Administration), pour éclaircir son effet bénéfique ou nuisible sur la survie des patients. Ces nouveaux essais auront également pour but de démontrer une différence de réponse au traitement entre les patients qui expriment le récepteur à l'Epo et ceux qui ne l'expriment pas. De plus, les doses utilisées doivent être standardisées en fonction des cas ou des types de cancer (Rizzo *et al.* 2008).

1.2 La cytokine Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α)

Le TNF α a été isolé en 1975 par Carswell *et al.* sous forme d'un facteur soluble libéré par les cellules de l'hôte ayant provoqué la nécrose d'une tumeur transplantée (Carswell *et al.* 1975). C'est une cytokine pro-inflammatoire produite par les macrophages, les neutrophiles, les fibroblastes, les kératinocytes, les astrocytes, et les lymphocytes T et B. Il fait partie d'une famille de protéines qui joue un rôle majeur dans l'inflammation, la prolifération, la survie cellulaire et l'hématopoïèse.

Le TNF α agit sur différents récepteurs membranaires dont les mieux décrits sont le TNFR1 et le TNFR2. Il est capable de stimuler des voies pro-apoptotiques mais aussi anti-apoptotiques et de survie (Figure 1). Les principaux facteurs de ces voies, c-jun, p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase), NF- κ B (Nuclear factor-kappa B) et les caspases sont activés par différents stimuli. Le TNF α induit ses effets principalement *via* la voie impliquant le facteur de transcription NF- κ B. Ce facteur régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans le processus inflammatoire tels que les cytokines de l'inflammation, les facteurs de croissance, des récepteurs de cytokines, les protéines de stress et les molécules d'adhérence des leucocytes. Ainsi, à travers l'activation du facteur NF- κ B dont la forme la plus active est le dimère p50(NF- κ B1)/p65(Rel A), le TNF α peut induire l'expression de plus de 200 gènes. La cycline D1, MMP9 (métalloprotéase 9), c-Myc, Bcl-xL (B cell lymphoma - extra large), PU.1, c-IAP2 (inhibitor of apoptosis 2) et COX2 (cyclooxygénase 2) sont quelques-uns de ces gènes (Aggarwal 2004).

NF- κ B est un dimère composé de différentes combinaisons possibles de deux sous-unités. Ainsi des homodimères et des hétérodimères peuvent se former entre les sous-unités p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), p65 (Rel A), Rel B et C Rel. L'hétérodimère p50/p65, se comporte comme un puissant transactivateur de gène. Dans la cellule, en dehors de toute stimulation, le complexe p50/p65 est retenu dans le cytoplasme par son inhibiteur I κ B (inhibiteur de κ B) avec lequel il forme un complexe inactif. Suite à une stimulation du TNFR par le TNF α , l'inhibiteur I κ B est phosphorylé par la IKK (I κ B kinase), qui constitue un signal d'ubiquitination. I κ B est alors dégradé par le protéasome (voie canonique). Le dimère p50/p65 ainsi libéré est transloqué vers le noyau et se lie à l'ADN au niveau des séquences spécifiques pour réguler la transcription de ses gènes cibles.

La surexpression de TNF α est corrélée à plusieurs maladies inflammatoires chroniques. En particulier le TNF α a été impliqué dans l'arthrite rhumatoïde (Feldmann *et al.* 1996), la maladie de Crohn (van Dullemen *et al.* 1995), l'hépatite C chronique (Knobler *et al.* 2005) et la

pancréatite (Friess *et al.* 1999). Actuellement il existe trois antagonistes du TNF α commercialisés. Ces molécules sont l'etanercept (Enbrel[®]), l'infliximab (Remicade[®]) et l'adalimumab (Humira[®]). L'etanercept a été le premier antagoniste du TNF α à être utilisé en tant qu'agent thérapeutique (Elliott *et al.* 1994), avec une bonne efficacité dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde (Haraoui 2005). Les deux autres antagonistes sont également utilisés pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn. L'efficacité du traitement varie selon la maladie traitée et la molécule utilisée (Haraoui 2005). Le risque d'infection augmente et neutralise ainsi les effets bénéfiques du traitement anti-TNF α dans les maladies inflammatoires chroniques (Vilcek *et al.* 2004). Par ailleurs, le traitement anti-TNF α peut provoquer l'apparition de différents types de cancers comme les lymphomes, le cancer du sein, du poumon et de la peau (Scheinfeld 2004; Yan *et al.* 2006).

1.2.1 TNF α , inflammation et cancer

Dès le 19^e siècle, Rudolf Virchow avait souligné la relation entre l'inflammation chronique et la cancérogenèse. Depuis lors, il est devenu évident que la combinaison des altérations génétiques et les médiateurs de l'inflammation sont étroitement associés avec la progression cancéreuse (Mantovani *et al.* 2008 ; Porta *et al.* 2009). La majorité des tumeurs sont infiltrées par des cellules inflammatoires telles que les myélomonocytes et plus spécialement les macrophages (Sica *et al.* 2007). En réponse à l'environnement inflammatoire, ces cellules produisent des médiateurs inflammatoires comme les chémokines et les cytokines. De ce fait, la présence du TNF α ainsi que d'autres cytokines, chémokines et enzymes inflammatoires a été confirmée dans le microenvironnement tumoral (Balkwill *et al.* 2001; Balkwill 2004). Ces molécules sont sécrétées par les macrophages recrutés par des signaux de provenance tumorale comme par exemple le VEGF-A (vascular endothelial growth factor) (Bingle *et al.* 2002). Elles conduisent à la prolifération et à la progression tumorale, au remodelage de la matrice tumorale, à l'inhibition de l'immunité adaptative et à l'angiogenèse (Obermueller *et al.* 2004; Pikarsky *et al.* 2004; Pollard 2004; Wyckoff *et al.* 2004) (Figure 2).

Le TNF α est également synthétisé par les cellules épithéliales dans les cancers ovariens et rénaux ou par les cellules stromales du cancer du sein (Balkwill 2002). L'effet du TNF α est surtout associé à la réponse inflammatoire. De plus, administré à des concentrations élevées, le TNF α provoque une nécrose hémorragique et peut activer une réaction inflammatoire anti-tumorale. Cependant il est de plus en plus évident que le TNF α est sécrété par les cellules

tumorales et qu'il peut agir dans ce cas comme un promoteur de tumeur (Balkwill *et al.* 2001). Des études sur des souris KO (knock out) pour le TNF α et/ou le TNFR1 ont démontré une diminution de l'incidence inflammatoire induite par les tumeurs (Moore *et al.* 1999; Arnott *et al.* 2004; Pikarsky *et al.* 2004) (Figure 2).

1.2.2 TNF α et anémie

Des études menées *in vivo* (Johnson *et al.* 1989; Papadaki *et al.* 2002) et *in vitro* (Dai *et al.* 1998; Xiao *et al.* 2002; Morceau *et al.* 2006; Buck *et al.* 2008) ont décrit le TNF α comme étant un inhibiteur de l'érythropoïèse. Plusieurs mécanismes ont été proposés en ce qui concerne l'action du TNF α sur les différents acteurs impliqués dans l'érythropoïèse. Xiao *et al.* ont montré que le TNF α inhibe *in vitro* la synthèse du marqueur GPA (Glycophorine A) au niveau des précurseurs érythroïdes (Xiao *et al.* 2002). Le TNF α peut également avoir un effet inhibiteur au niveau de la prolifération des progéniteurs érythroïdes. Beyne-Rauzy *et al.* suggèrent que le TNF α induit la sénescence des cellules leucémiques et myéloïdes saines en régulant négativement le gène de la télomérase entraînant l'arrêt de leur prolifération (Beyne-Rauzy *et al.* 2004; Beyne-Rauzy *et al.* 2005). De plus, le TNF α est responsable du « mutisme » de gènes érythroïdes telle que l'Epo *via* notamment NF- κ B et GATA-2 (La Ferla *et al.* 2002), le REpo et la globine γ (Morceau *et al.* 2006) (Figure 3). De plus, Liu *et al.* ont démontré le rôle inhibiteur de NF- κ B sur l'expression des gènes érythroïdes, principalement par le blocage de l'activité des promoteurs des globines α (Liu *et al.* 2003). Cependant, Tsopra *et al.* ont mis en évidence la relation entre le taux élevé de TNF α (trois fois plus que chez des patients sains) et l'anémie chez des patients atteints d'une leucémie lymphoïde chronique (LLC) (Tsopra *et al.* 2009).

L'expression du TNF α est associée à plusieurs maladies hématologiques telles que l'anémie de Fanconi (Dufour *et al.* 2003), les syndromes myélodysplasiques (Gersuk *et al.* 1998), l'anémie aplasique (Young 2000) et l'anémie de maladies chroniques (Nakano *et al.* 2004). Il a été démontré *in vivo* que des patients traités au TNF α présentent une diminution de la synthèse d'hémoglobine (Blick *et al.* 1987) et que cette diminution est inversée après traitement avec un anti-TNF α (Papadaki *et al.* 2002; Dubey *et al.* 2005).

Les précédents résultats du laboratoire obtenus *in vitro* ont montré que le TNF α limite la surexpression de gènes érythroïdes spécifiques dans la lignée érythroleucémique humaine K562, dépendante d'agents pharmacologiques tels que l'aclacynomycine. Ces résultats sont corrélés à l'inhibition de la protéine GATA-1, un facteur de transcription-clé de la différenciation

érythroïde. Morceau *et al.* ont démontré que le TNF α diminue l'activité transcriptionnelle de GATA-1 par des transfections transitoires dans la lignée K562. Ces résultats ont été corrélés à l'inhibition de l'expression des gènes érythroïdes cibles de GATA-1 tels que le REpo et la globine γ (Morceau *et al.* 2006).

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action du TNF α sur l'inhibition de la différenciation érythroïde, Buck *et al.* ont utilisé deux lignées érythroleucémiques humaines, K562 et HEL inductibles par différents composés chimiques (Aclacynomycine A et Doxorubicine). Ils ont étudié l'effet du TNF α sur les facteurs de transcription importants pour la différenciation érythroïde comme les facteurs GATA-1, GATA-2 et FOG1. Ils ont corrélé la diminution de l'expression de GATA-1 avec sa dégradation protéasomique. De plus, ils ont observé une diminution de l'expression de FOG1 à la suite du traitement au TNF α . Le complexe GATA-1/FOG1 est ainsi affecté. Par ailleurs, l'acétylation de GATA-1, qui est nécessaire pour son activité transcriptionnelle, est diminuée par le TNF α dans les deux lignées (Buck *et al.* 2009).

En utilisant la lignée cellulaire TF1 qui est dépendante de l'Epo pour sa survie et sa différenciation érythroïde, Buck *et al.* ont obtenu des résultats en accord avec ceux observés dans les lignées K562 et HEL. De plus, les auteurs montrent que le TNF α inverse la balance GATA-1/GATA-2 dans cette lignée. GATA-2 augmente après le traitement au TNF α alors que GATA-1 diminue. Le complexe GATA-1/FOG1 diminue à cause de la dégradation de FOG1 par le protéasome. Finalement, les auteurs suggèrent que la voie MAPK p38 est impliquée dans l'inhibition de l'érythropoïèse par le TNF α (Buck *et al.* 2008).

L'ensemble de ces études reste en accord avec une diminution du taux de cellules capables de synthétiser de l'hémoglobine et l'expression de gènes érythroïdes cibles de GATA-1, comme le REpo et la globine γ .

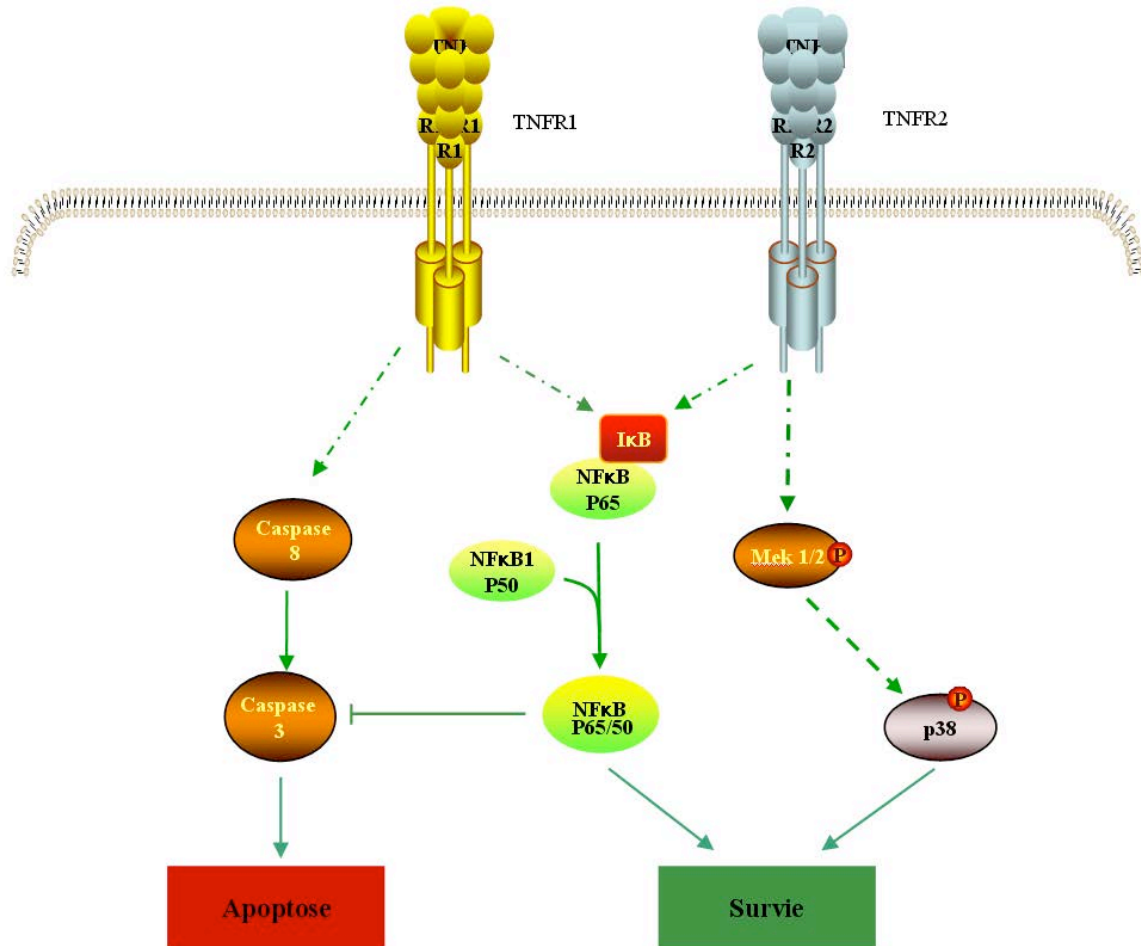


Figure 1 : Voies de signalisation activées par le TNF α

Le TNF α agit sur deux récepteurs membranaires distincts (TNFR1 et TNFR2). Il active simultanément des voies apoptotiques, anti-apoptotiques et de survie. Les principaux facteurs de ces voies sont p38MAPK, NF- κ B (Nuclear factor-kappa B) et les caspases. Le TNF α induit ses effets principalement via la voie impliquant le facteur de transcription NF- κ B (Adapté de (Aggarwal 2003)).

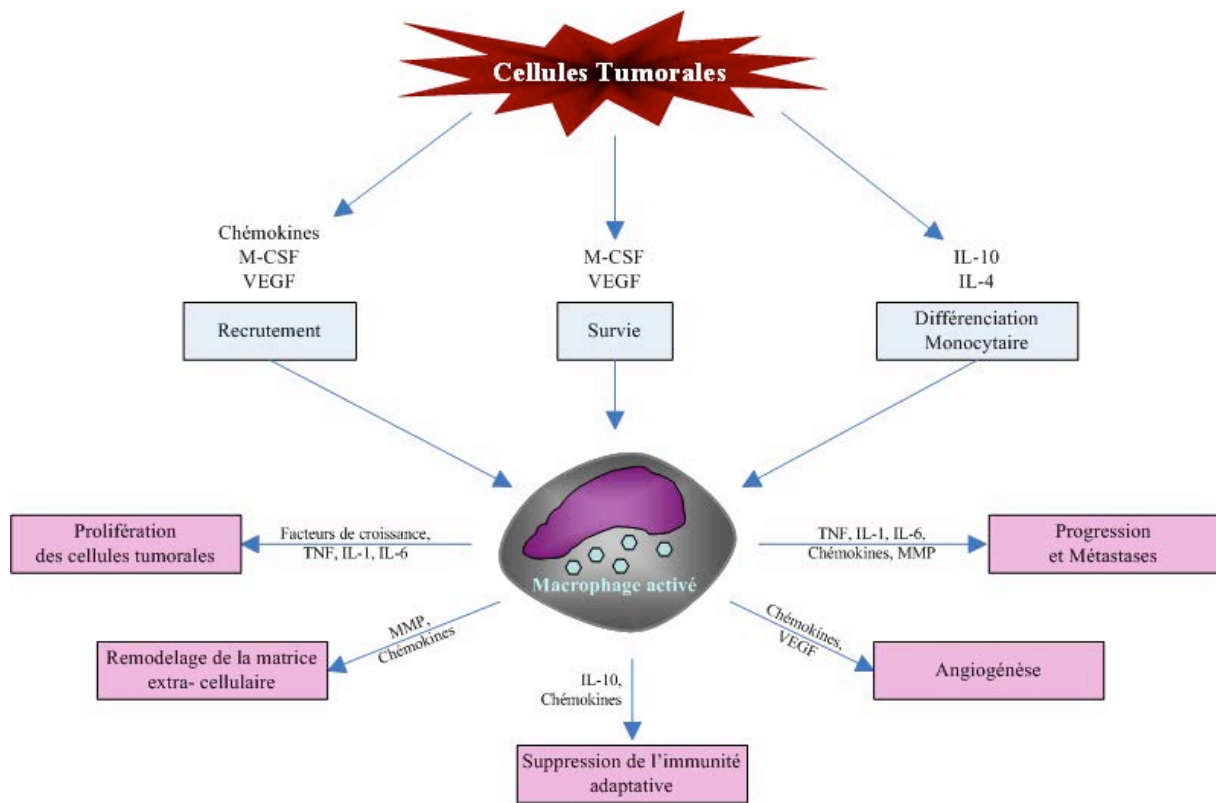


Figure 2 : TNF α et progression tumorale

Les cellules tumorales recrutent et activent des macrophages au niveau des tumeurs. Les macrophages activés libèrent des cytokines (IL1, IL6, IL10 et TNF), des facteurs de croissance (VEGF), des chémokines et des métalloprotéases matricielles (MMP). Le TNF α favorise la prolifération des cellules tumorales, la progression de la tumeur et la formation de métastases. M-CSF: monocyte-colony stimulating factor; VEGF: vascular endothelial growth factor; IL: Interleukine; TNF: Tumor necrosis Factor (adapté de (Balkwill *et al.* 2001)).

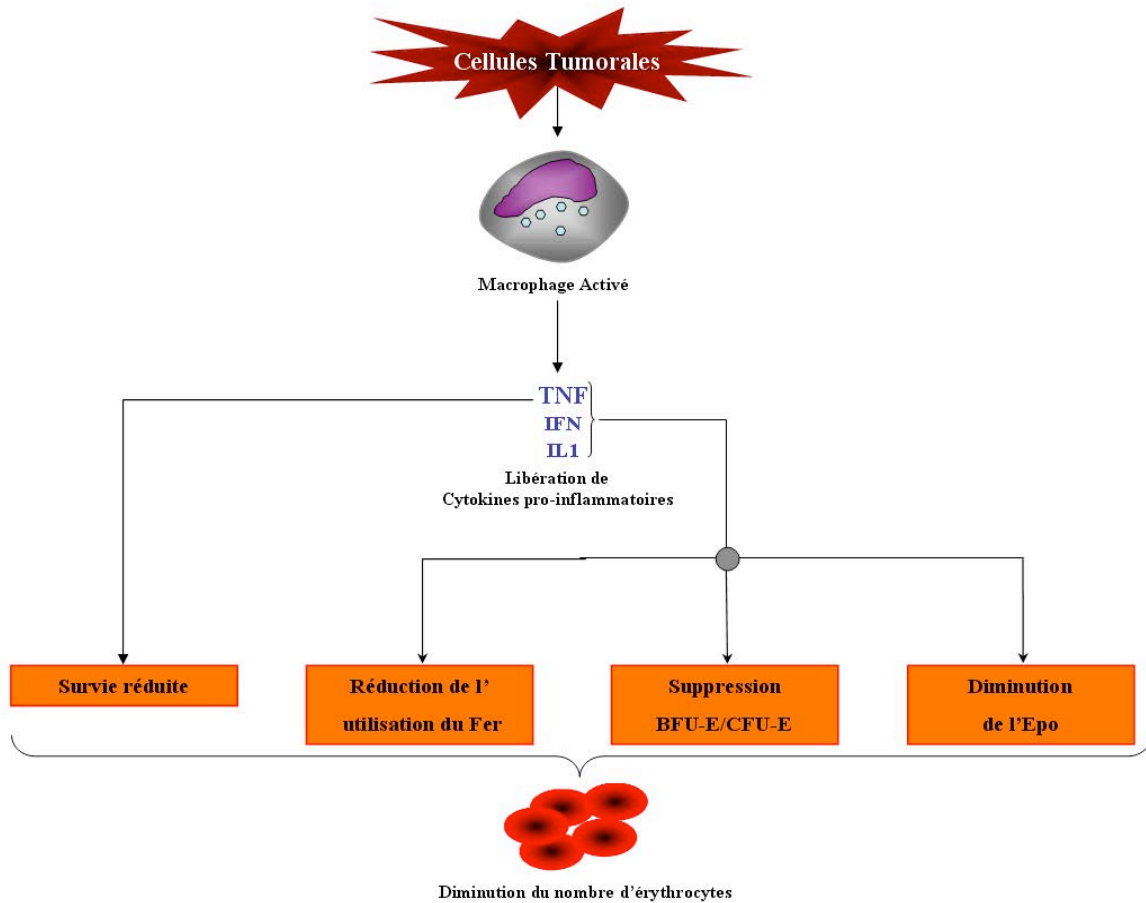


Figure 3 : TNF α et anémie liée au cancer

Le TNF α est retrouvé dans le microenvironnement tumoral. Il a une action directe sur la survie des érythrocytes et, en coopération avec d'autres cytokines (IFN et IL1), sur la réduction de l'utilisation du fer, sur la suppression des progéniteurs érythroïdes BFU-E et CFU-E et sur la diminution de la synthèse de l'Epo. TNF: Tumor necrosis factor; IFN: Interféron; BFU-E: burst forming units-érythroïde; CFU-E: colony forming units-érythroïde; Epo: érythropoïétine (adapté de (Buck *et al.* 2009)).

1.3 L'hématopoïèse

L'hématopoïèse est l'ensemble des phénomènes qui assurent la synthèse et le remplacement continu et régulé des cellules sanguines. Avant la naissance, l'hématopoïèse se déroule d'abord dans les îlots sanguins de la vésicule vitelline puis dans le foie, la rate et les ganglions lymphatiques. Chez l'adulte, elle se déroule uniquement dans la moelle osseuse de l'os sternal, des os iliaques et du fémur. Les cellules sanguines sont, pour la plupart d'entre elles, très différenciées avec une capacité réduite de synthèse protéique et de division cellulaire. Leur durée de vie est relativement courte puisqu'elle est de quelques jours pour les plaquettes à quelques semaines pour les globules rouges. Elles constituent les éléments terminaux et fonctionnels des deux lignées hématopoïétiques principales, la lignée lymphoïde et la lignée myéloïde. L'hématopoïèse aboutit à la production d'un nombre considérablement important de cellules sanguines (environ 10×10^{13} cellules/jour). Cette production massive est assurée par une petite population de cellules de la moelle osseuse appelées cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ce sont des cellules indifférenciées et multipotentes avec des propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation. Elles expriment des marqueurs de surface qui leur sont caractéristiques tels que le CD (cluster de différenciation) 34 et le CD135. Au cours de l'hématopoïèse, le marqueur CD34 est conservé jusqu'au stade des progéniteurs érythroïdes, BFU-E (Burst forming units – Erythroïde). Le CD34 est par conséquent le marqueur spécifique utilisé pour isoler les progéniteurs hématopoïétiques ainsi qu'érythrocytaires immatures. Les CSH peuvent être isolées à partir du sang de cordon ombilical, du sang périphérique et de la moelle osseuse. Le sang de cordon est cependant beaucoup plus riche en CSH que les deux autres sources. Elles peuvent également être identifiées par immunomarquage et tri magnétique sur colonne (Broxmeyer *et al.* 1989; Broxmeyer *et al.* 1993; Broxmeyer *et al.* 2005). La régulation de l'auto-renouvellement, de la prolifération et de la différenciation de toutes les cellules souches progénitrices et des précurseurs plus engagés, implique l'action de cytokines, de chémokines, de facteurs de croissance, de facteurs de transcription (Broxmeyer *et al.* 2005; Wickrema *et al.* 2007) (Figure 4 et Figure 5) ainsi que des interactions cellules-cellules impliquant les cellules stromales de la moelle osseuse. Les CSH peuvent évoluer et se différencier suivant les deux lignées hématopoïétiques spécifiques, myéloïde et lymphoïde. Une CSH va ainsi devenir un progéniteur hématopoïétique, puis un précurseur de la lignée lymphoïde ou myéloïde. Les progéniteurs sont des cellules avec une capacité d'auto-renouvellement et de multipotence plus restreinte que celle des CSH. La cellule progénitrice lymphoïde (CPL) sous l'effet de l'IL7, va se différencier d'abord en précurseurs immatures, les

lymphoblastes (pro- et pré-lymphoblaste), pour aboutir aux lymphocytes T et B. La cellule progénitrice myéloïde (CPM) se différencie sous l'effet de l'IL3 et du « Stem cell factor » (SCF), en progéniteur Granulocyte-Monocyte (PGM) ou en progéniteur Mégacaryo-Erythroïde (PME). Ensuite, l'action de facteurs spécifiques sur les cellules progénitrices donne naissance à des progéniteurs engagés « Colony forming units » (CFU) de type, Granulo-Monocytaire (-GM), Basophile (-Baso), Eosinophile (-Eo), Mégacaryocytaire (-MK) et Erythrocytaire (-E). Ces progéniteurs sont spécifiques d'une seule lignée et aboutissent eux-mêmes par la suite aux monocytes/macrophages, granulocytes (neutrophile, basophile, éosinophile), érythrocytes et thrombocytes (plaquettes) (Figure 4). Pendant l'hématopoïèse, un équilibre s'établit entre la production des cellules souches par division cellulaire (auto-renouvellement), et la perte des cellules souches par engagement vers les lignées cellulaires (différenciation).

Les cellules hématopoïétiques se différencient et prolifèrent dans la moelle osseuse. Une fois leur maturation achevée, elles gagnent la circulation pour atteindre les tissus. Les lymphocytes font exception puisqu'ils terminent leur maturation dans le thymus, les nœuds lymphatiques et la rate.

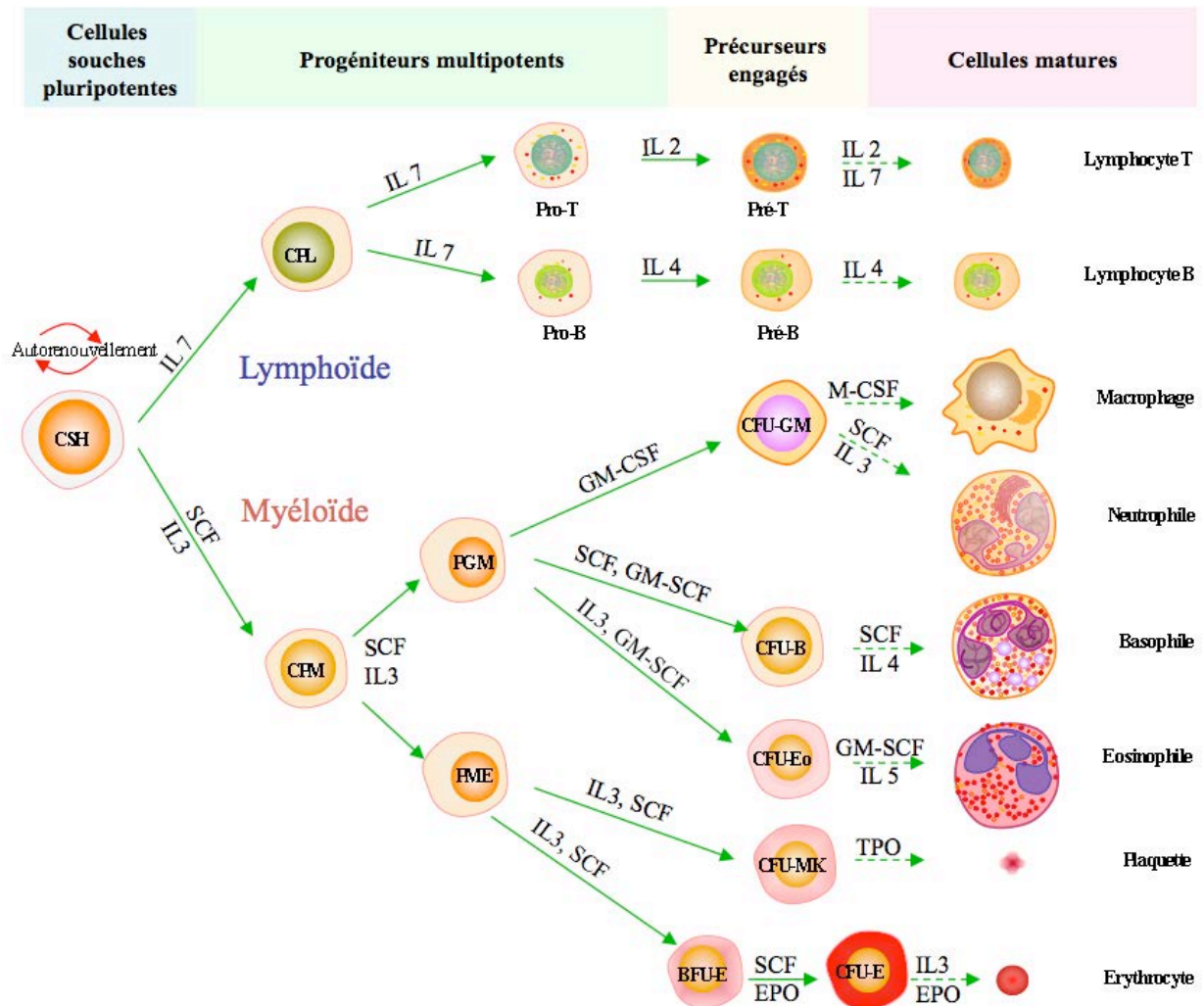


Figure 4 : L'hématopoïèse et les cytokines

La cellule souche hématopoïétique (CSH) va s'engager vers la lignée myéloïde ou lymphoïde en fonction des cytokines qui agissent sur elle. La CSH génère des cellules progénitrices myéloïdes (CPM) ou lymphoïdes (CPL). L'action des différentes combinaisons de cytokines sur ces progéniteurs va conduire à la production de la totalité des cellules retrouvées dans la circulation sanguine. Pro-T ou B: pro-lymphoblaste T ou B; pré-T ou B: pré-lymphoblaste T ou B; PME : Progéniteur Mégacaryo-Erythroïde ; BFU-: Burst Forming Units-; CFU-: Colony Forming Units-; PGM: Progéniteur Granulocyte-Monocyte; B: Basophile; Eo: Eosinophile; MK: Mégacaryocyte; E : Erythroïde; IL: interleukine; SCF: stem cell factor; GM-CSF: granulocyte-colony stimulating factor; M-CSF: monocyte-colony stimulating factor; TPO: thrombopoïétine; EPO: érythropoïétine.

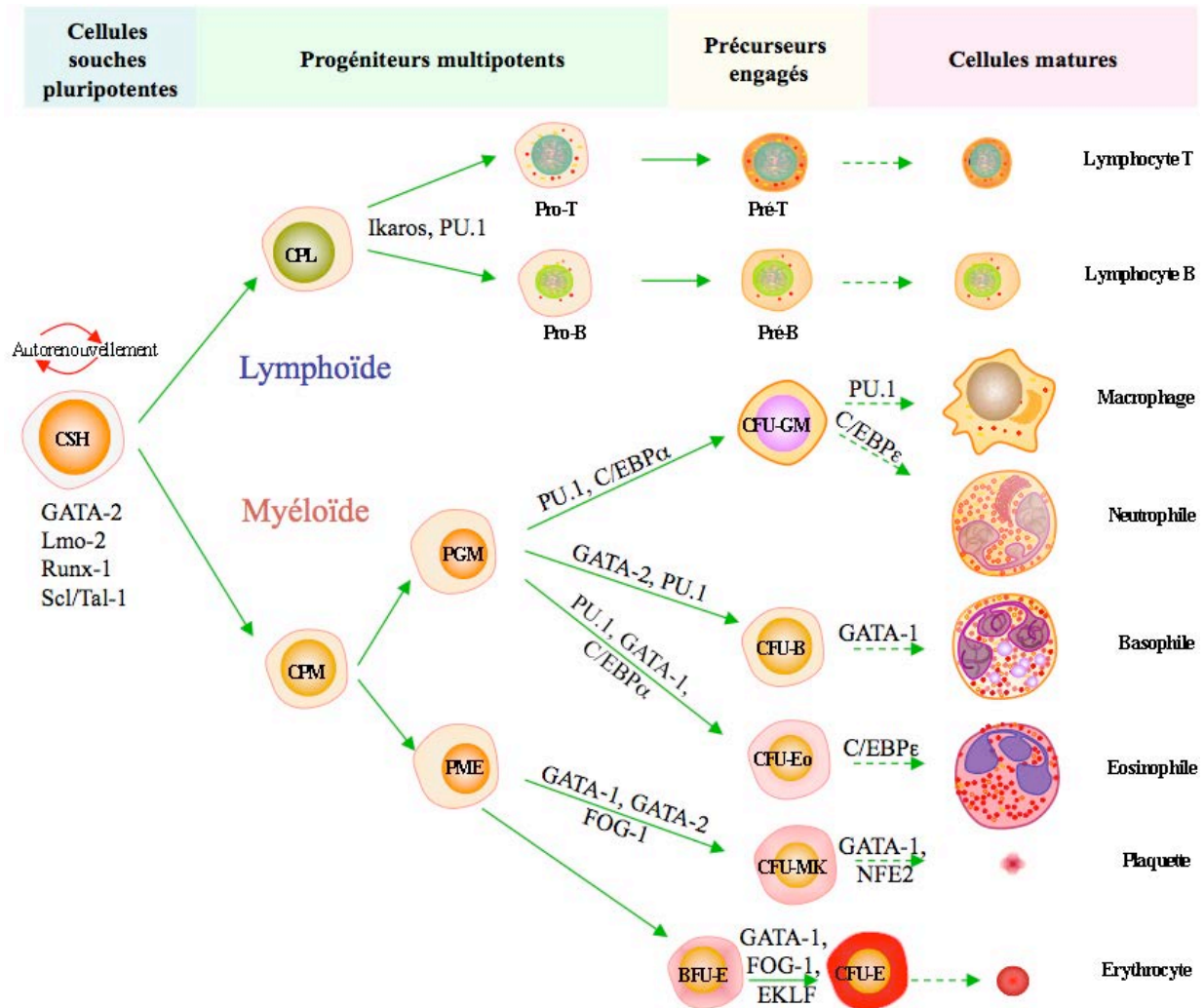


Figure 5: Les facteurs de transcription au cours de l'hématopoïèse

La cellule souche hématopoïétique (CSH) va s'engager vers la lignée myéloïde ou lymphoïde en fonction de l'expression des facteurs de transcription. Leur action va diriger l'expression de gènes spécifiques de chacune des voies de différenciation. CPL : cellule progénitrice lymphoïde ; CPM : cellule progénitrice myéloïde ; Pro-T ou -B: pro-lymphoblaste T ou B; pré-T ou B: pré-lymphoblaste T ou B; CFU-: Colony Forming Units-; BFU-: Burst Forming Units-; PGM: Progéniteur Granulocyte-Monocyte; PME : Progéniteur Mégacaryo-Erythroïde; B: Basophile; Eo: Eosinophile; MK: Mégacaryocyte; E : Erythroïde; Lmo-2 : LIM only protein; Runx-1 : Runt-related transcription factor; Scl/Tal-1 : Stem cell leukemia/T-cell acute lymphoblastic leukemia 1 ; FOG-1 : (Friend of GATA)-1 ; EKLF : Erythroid Kruppel-like factor; NFE2 : Nuclear factor erythroid ; C/EBP : CCAAT-enhancer binding protein (adapté de (Orkin *et al.* 2008)).

1.4 Plasticité et reprogrammation des cellules souches hématopoïétiques

La différenciation des cellules souches est considérée comme étant linéaire et unidirectionnelle par inactivation irréversible de gènes spécifiques pour une autre voie de différenciation que celle initialement inscrite sur l'identité phénotypique de la cellule. L'irréversibilité de l'inactivation des gènes est due à la condensation de l'ADN en hétérochromatine. Les phénomènes associés à la condensation de la chromatine et qui conduisent à la répression de l'expression des gènes sont l'hyperméthylation des îlots CpGs (Klein *et al.* 1997) et la désacétylation des histones (Cheung *et al.* 2000). Cet ancien dogme est basé sur le fait qu'une cellule souche spécialisée pour un tissu ne peut donner que des cellules du même type tissulaire et au contraire une cellule donnée ne peut provenir que d'un progéniteur bien défini.

Depuis, il est de plus en plus établi que le statut des cellules souches est dynamique puisqu'elles peuvent répondre à une variété de signaux qui leur dictent des voies distinctes de différenciation possibles. De plus, les cellules souches matures peuvent transiter à travers la circulation et s'implanter dans un nouveau tissu en s'adaptant à ce nouveau microenvironnement (Blau *et al.* 2001). La capacité des cellules souches matures à s'affranchir des barrières de différenciation et à adopter le phénotype fonctionnel de cellules qui appartiennent à un autre type de tissu décrit la plasticité des cellules en général et pas seulement des cellules souches (Theise *et al.* 2003). Elles peuvent de ce fait, emprunter différentes voies de différenciation (Theise 2010) (Figure 6). C'est pour cette raison que les cellules reflètent une fonction soumise à régulation plutôt qu'une entité distincte et engagée de manière irréversible.

Ainsi, au cours des années 1990, plusieurs équipes se sont intéressées à la plasticité des cellules souches matures. Leurs études ont révélé que les cellules de la moelle peuvent générer du tissu musculaire (Ferrari *et al.* 1998), que les cellules souches neuronales peuvent donner des cellules hématopoïétiques (Bjornson *et al.* 1999), et que les CSH peuvent donner des cellules hépatiques (Petersen *et al.* 1999).

Du fait de la capacité de reprogrammation et de plasticité cellulaire, le système hématopoïétique est utilisé pour l'étude *in vitro* des mécanismes de différenciation. Plusieurs évidences de reprogrammation ont été démontrées au sein de ce système grâce à la facilité d'isolement et de caractérisation des CSH. La présence ou l'absence, mais aussi le taux d'expression des facteurs de transcription, déterminent le sort des CSH et maintiennent l'équilibre qui existe entre physiologie et pathologie (Kulesa *et al.* 1995 ; Querfurth *et al.*

2000 ; Iwasaki *et al.* 2003 ; Laiosa *et al.* 2006 ; Iwasaki *et al.* 2007 ; Taghon *et al.* 2007) (Figure 7).

Cependant l'étude de la plasticité cellulaire nécessite de suivre des principes stricts pour la mise en place de protocoles expérimentaux et l'analyse des données. Tout d'abord, toute cellule qui contient un génome intact (sans délétions, ni translocations, ni duplications, ni mutations) pourrait potentiellement devenir une cellule d'un autre type cellulaire. Ensuite, toute tentative d'analyse d'une cellule altère sa nature à partir du moment où elle est isolée. Ceci doit par conséquent être pris en considération pour l'étude des stades intermédiaires de différenciation. Enfin, la description des progéniteurs et de leurs cellules dérivées doit être décrite de manière stochastique (Theise 2010).

Les critères de validation du changement du sort des cellules englobent trois différents aspects. Premièrement, un gène qui auparavant était silencieux doit être exprimé par la «nouvelle» cellule. Deuxièmement, les cellules doivent être correctement intégrées dans leur nouvelle structure tissulaire sans qu'il soit possible de les distinguer des cellules voisines. Elles doivent en plus exprimer des marqueurs spécifiques du nouveau tissu. Enfin, les « nouvelles » cellules doivent être parfaitement fonctionnelles et en harmonie avec les cellules voisines du même tissu (Blau *et al.* 2001).

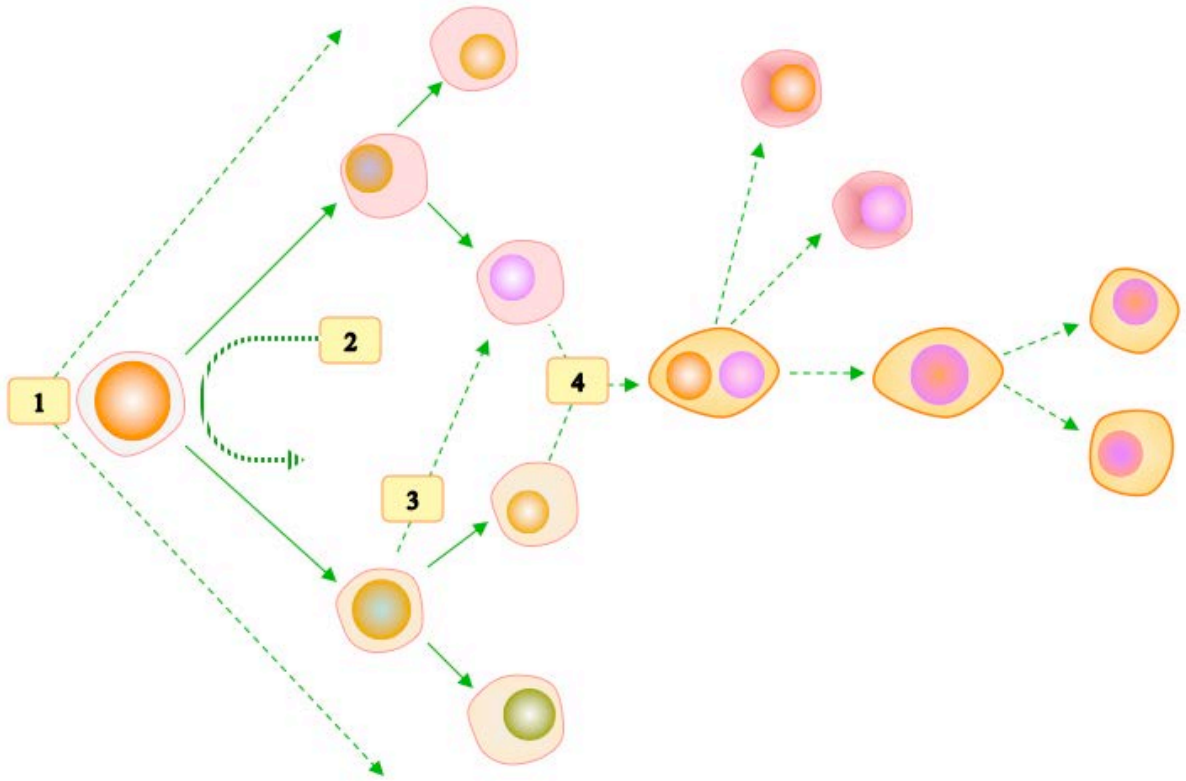


Figure 6: La plasticité cellulaire des cellules souches

1 : Voies de différenciation canoniques impliquées dans le développement et la réparation/maintenance des tissus adultes.

2 : Dédifférenciation et redifférenciation observées au cours de réparation/régénération tissulaire et dans des cancers.

3 : Différenciation directe des cellules en traversant des barrières tissulaires et en changeant de phénotype en réponse au nouveau microenvironnement.

4 : Les cellules fusionnent avec des cellules à un stade de différenciation plus avancé pour donner un hétérocaryon tétraploïde (adapté de (Theise 2010)).

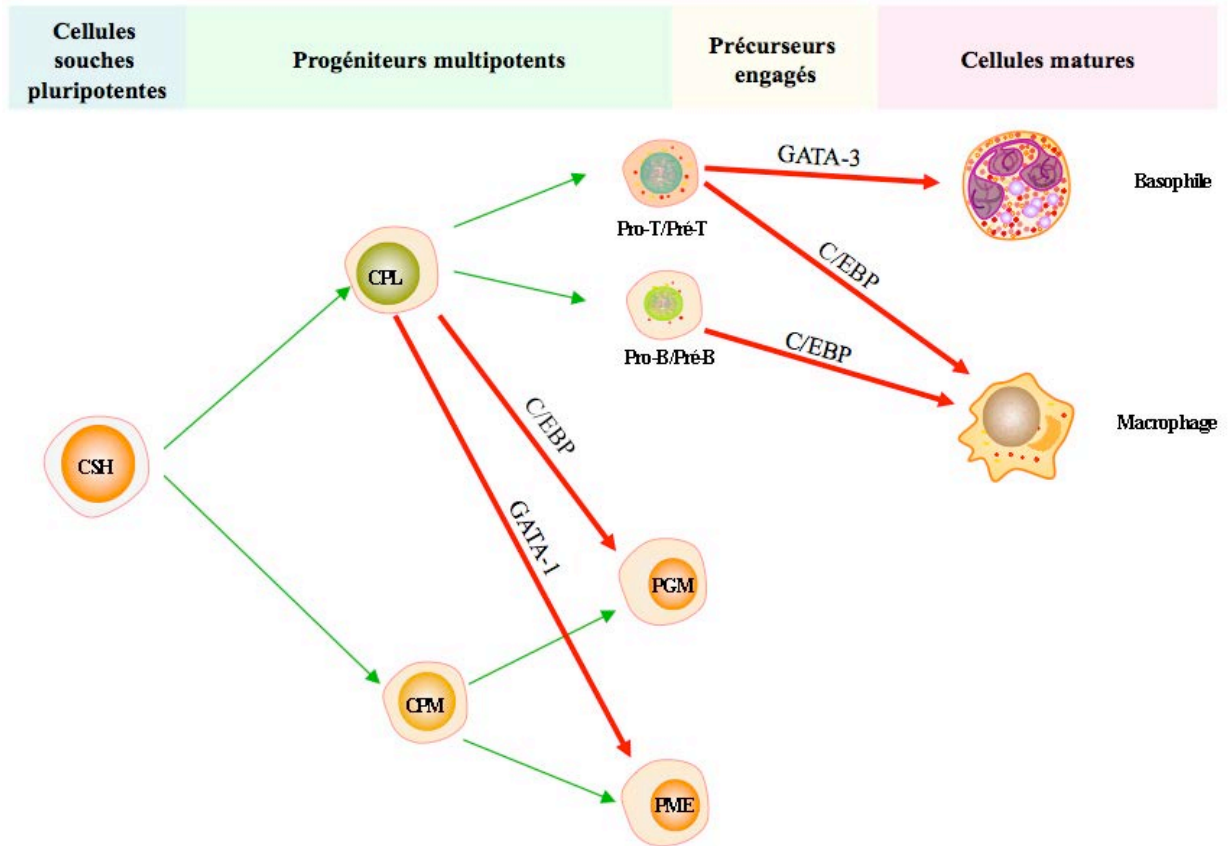


Figure 7: La reprogrammation des CSH

Les flèches rouges signalent les reprogrammations dues à l'expression des facteurs de transcription : GATA-1, C/EBP, GATA-3. CSH : cellule souche hématopoïétique; Pro-T ou -B: pro-lymphoblaste T ou B; pré-T ou B: pré-lymphoblaste T ou B ; CPL : cellule progénitrice lymphoïde ; CPM : cellule progénitrice myéloïde ; PGM: Progéniteur Granulocyte-Monocyte; PME : Progéniteur Mégacaryo-Erythroïde ; C/EBP : CCAAT/enhancer binding protein (adapté de (Orkin *et al.* 2008)).

1.5 L'érythropoïèse

1.5.1 Les modifications cellulaires au cours de l'érythropoïèse

L'érythropoïèse, qui est une branche de l'hématopoïèse, est un processus complexe qui aboutit à la formation des érythrocytes (globules rouges) à partir d'une CSH. Le rôle principal des érythrocytes est le maintien de l'oxygénation des tissus. Le nombre d'érythrocytes produits par jour est de 2×10^{11} et leur durée de vie est en moyenne de 120 jours. Une CSH va s'engager dans la voie de différenciation myéloïde pour donner la cellule CPM. Sous l'influence de l'Epo, du facteur de croissance SCF (stem cell factor) et de l'IL3, la CPM va se différencier en BFU-E qui va donner le CFU-E. Le progéniteur CFU-E va s'engager plus dans la différenciation pour donner des précurseurs érythroblastiques (proérythroblastes et érythroblastes) et enfin des érythrocytes. Au cours de la différenciation et de la maturation érythroïde, des modifications morphologiques des progéniteurs et des précurseurs sont observées. Ces variations entraînent une diminution de la taille cellulaire, une condensation de la chromatine, la perte du noyau (énucléation) et enfin une augmentation de la quantité d'hémoglobine synthétisée (Figure 8). Le BFU-E et le CFU-E sont les premiers progéniteurs identifiables en culture par leur capacité à former des colonies *in vitro* (Gregory *et al.* 1978). Le proérythroblaste contient une chromatine finement granulaire et son cytoplasme est légèrement basophile. Il se différencie en érythroblaste basophile dont le noyau arrondi contient une chromatine plus condensée. La basophilie de son cytoplasme est attribuée à son contenu élevé en ribosomes. L'érythroblaste basophile se différencie ensuite en érythroblaste polychromatophile dont le noyau plus petit, renferme une chromatine encore plus condensée. Son cytoplasme contient des ribosomes basophiles et de l'hémoglobine acidophile nouvellement synthétisée. Il se différencie en érythroblaste polychromatophile qui commence à expulser son noyau. Ce dernier va se transformer par la suite en érythroblaste orthochromatophile qui va perdre sa basophilie cytoplasmique et continuer à expulser son noyau. Finalement après expulsion complète du noyau, la cellule anucléée immature va donner un érythrocyte ou globule rouge (Figure 8).

La caractérisation phénotypique de la différenciation érythroïde se fait par l'évaluation de l'hémoglobine synthétisée et l'expression de marqueurs spécifiques précoces comme le CD34, le CD36 (récepteur de la famille « scavenger »), la HMBS (hydroxyméthylbilane synthase), l'ERAF (erythroid-associated factor), le CD71 (récepteur à la transferrine) et plus tardifs comme la Glycophorine A (GPA) (Robb 2007; Wickrema *et al.* 2007) (Figure 9).

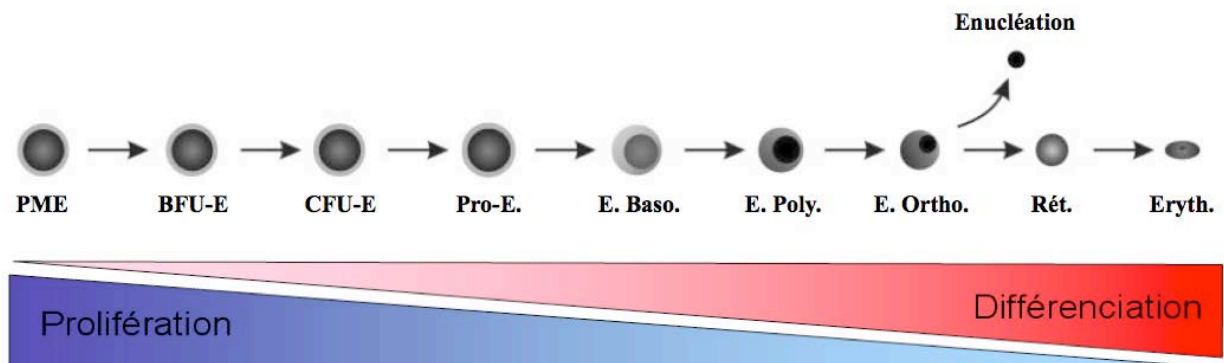


Figure 8 : L'érythropoïèse

L'érythropoïèse est le processus qui conduit à la production des globules rouges, ou érythrocytes, à partir d'une cellule progénitrice myéloïde. Au cours de la différenciation érythroïde des changements morphologiques apparaissent : la diminution de la taille cellulaire et du noyau, la condensation de la chromatine, l'augmentation du contenu en hémoglobine et enfin l'expulsion du noyau (énucléation). De plus, la cellule diminue sa prolifération au profit de sa différenciation. PME : Progéniteur Mégacaryo-Erythroïde ; BFU-E: Burst Forming Units-Erythroïde; CFU-E: Colony Forming Units-Erythroïde; Pro-E.: Proérythroblaste; E.Baso.: Erythroblaste basophile; E.Poly.: Erythroblaste polychromatophile; E.Ortho.: Erythroblaste orthochromatophile; Rét.: réticulocyte; Eryth.: érythrocyte (Adapté de (Ferreira *et al.* 2007)).

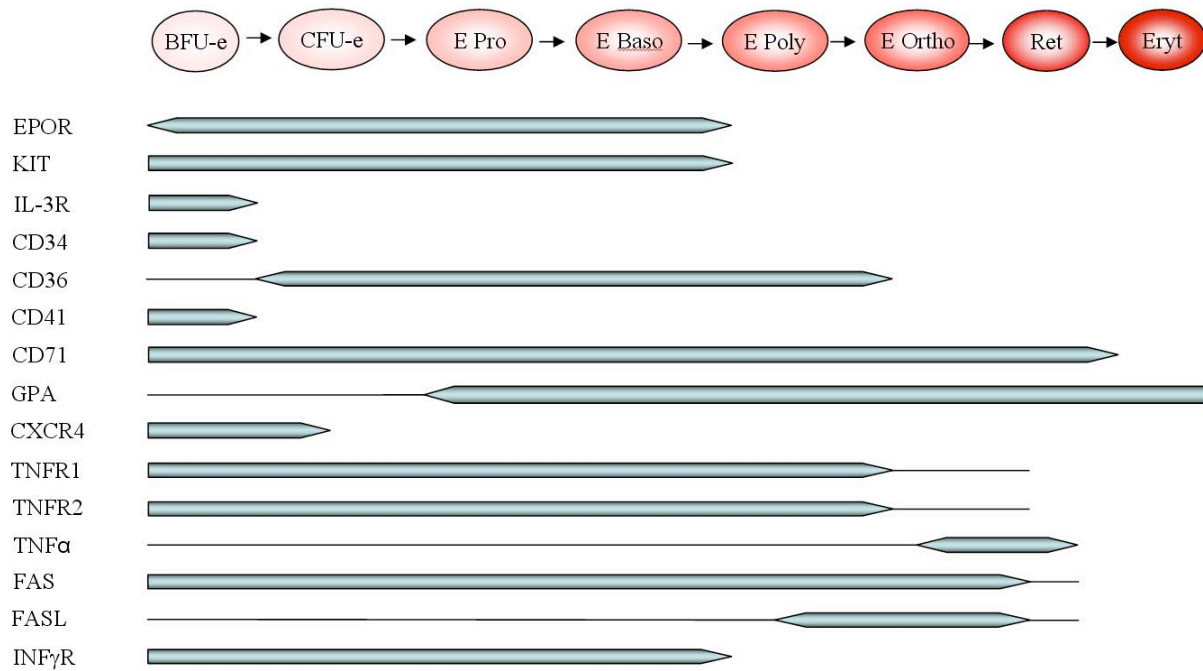


Figure 9 : Expression de récepteurs et d'autres protéines membranaires au cours de l'érythropoïèse

Les progéniteurs érythroïdes expriment des marqueurs membranaires nécessaires à leur progression dans la différenciation. L'expression des protéines membranaires représentée est approximative. La présence d'un récepteur ne suggère pas son activation. REpo: récepteur de l'érythropoïétine; KIT: récepteur du SCF; IL-3R: récepteur de l'IL3; CD34: glycoprotéine d'adhésion exprimée par les progéniteurs hématopoïétiques; CD36: protéine d'adhésion exprimée par les progéniteurs érythropoïétiques; CD41: protéine d'adhésion exprimée par les progéniteurs érythroïdes. CD71: récepteur de la transferrine; GPA: Glycophorine A; CXCR4: récepteur de la chémokine CXCL12; TNFR1 et 2: récepteurs du TNF; Fas et FasL: récepteur de mort et son ligand; IFN γ R: récepteur de l'interféron γ (adapté de (Spivak 2005)).

1.5.2 L'hémoglobine

L'hémoglobine (Hb) est le constituant majeur des globules rouges. Elle sert principalement de transporteur de l'oxygène vers les tissus et du CO₂ en retour. Elle est formée de quatre chaînes polypeptidiques, les globines, contenant chacune un groupement prosthétique, l'hème. Il existe plusieurs gènes de globines organisés en deux familles, α et β , situés respectivement sur les chromosomes 16 et 11. La famille des globines α est constituée de la globine embryonnaire ζ et des globines adultes $\alpha 1$ et $\alpha 2$. La famille des globines β est constituée de la globine embryonnaire ϵ , de la globine fœtale γ ($G\gamma$ et $A\gamma$) et des globines adultes δ et β . Dans les deux cas, les gènes des globines sont alignés sur le chromosome suivant l'ordre dans lequel ils vont être exprimés au cours du développement (embryonnaire, fœtal puis adulte). L'hémoglobine majoritairement exprimée après la naissance est l'Hb adulte constituée de deux chaînes de type α et de deux chaînes de type β .

L'hème est un complexe de porphyrine et de fer à l'état d'ion ferreux Fe²⁺. Chacun des quatre ions Fe²⁺ se combine de façon réversible à une molécule d'oxygène. La transferrine assure le transport du fer à un état plus oxydé (ferrique Fe³⁺) dans le sang. Elle pénètre dans les érythroblastes par endocytose grâce à des récepteurs transmembranaires (CD71). Après avoir cédé le Fe³⁺ aux érythrocytes, la transferrine redevient disponible (Beaumont *et al.* 2005). Le Fe²⁺ de l'hémoglobine libéré à partir des érythroblastes mal formés et des érythrocytes hémolysés ou sénescents, est transféré par endocytose dans les macrophages et est réutilisé à 97%. Le recyclage du fer est finement régulé et contrôlé par l'hepcidine (Nicolas *et al.* 2002; Beaumont *et al.* 2005).

1.5.3 L'îlot érythroblastique

La maturation des érythroblastes nécessite la présence d'unités anatomiques appelées îlots érythroblastiques. Ces unités sont composées d'un macrophage entouré d'érythroblastes à différents stades de maturation (Figure 10). Ces îlots sont situés dans la moelle osseuse et permettent aux érythroblastes d'entrer en contact avec le stroma et les cytokines du microenvironnement (Chasis 2006; Chasis *et al.* 2008). Les macrophages des îlots, appelés médullaires, jouent un rôle très important dans la maturation des érythroblastes. Ce rôle a été démontré par l'anémie létale provoquée par l'incapacité des macrophages d'interagir avec les

érythroblastes (Iavarone *et al.* 2004). Les interactions macrophages/érythroblastes et également érythroblastes/matrice extracellulaire font intervenir des molécules d'adhérence afin de maintenir l'intégrité de l'îlot érythroblastique (Simmons *et al.* 1992; Hanspal *et al.* 1998; Lee *et al.* 2006). Le macrophage est par ailleurs impliqué dans la phagocytose du noyau expulsé (Kawane *et al.* 2001). L'expulsion du noyau (énucléation) est un phénomène mécanique qui découle de la perte progressive d'affinité du réticulocyte pour le macrophage. Le noyau reste fixé au macrophage et est phagocyté à la suite d'exposition de phosphatidylsérines (Yoshida *et al.* 2005). Les réticulocytes anucléés peuvent poursuivre leur maturation pour atteindre la forme d'un disque biconcave. Cette forme est le résultat de remaniements importants du cytosquelette et de la perte de l'intégrité des organelles. Elle confère aux érythrocytes la flexibilité et l'élasticité qui leurs permettent de subir, tout en conservant leur intégrité, les déformations nécessaires à la circulation dans les microvaisseaux.

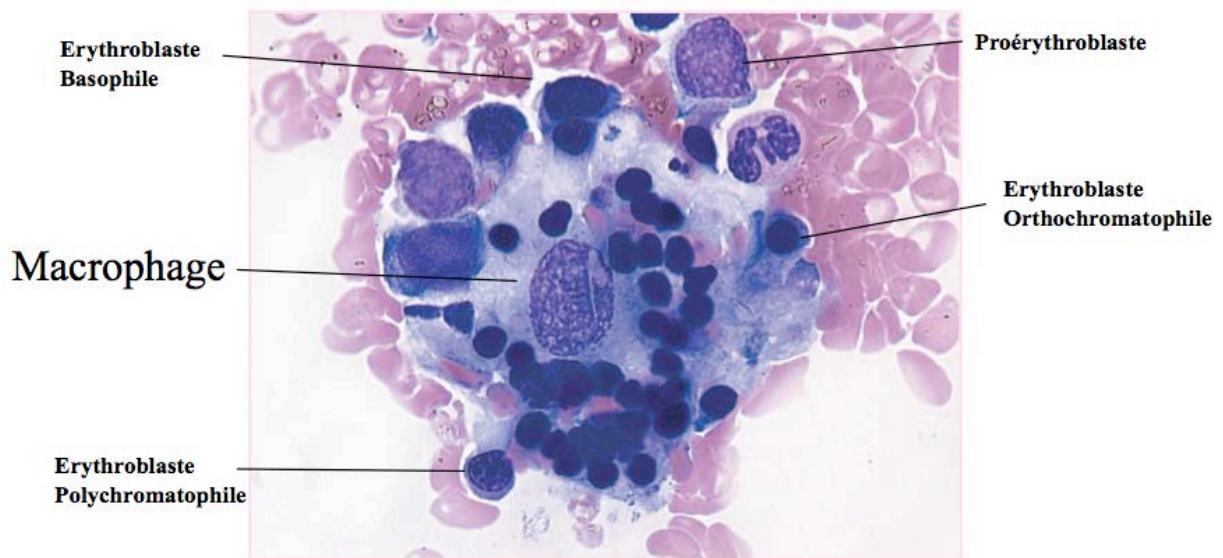


Figure 10 : Ilot érythroblastique

L'îlot érythroblastique situé dans la moelle osseuse, est composé d'un macrophage central entouré d'érythroblastes à différents stades de différenciation. Il joue un rôle important dans le processus de l'érythropoïèse, puisqu'il permet le recyclage des globules rouges et du fer et l'interaction des érythroblastes avec la matrice et les cytokines. (Photo de Peter Maslak, Blood 2004).

1.5.4 L'érythropoïétine

L'érythropoïétine (Epo) est une glycoprotéine circulante qui est produite à 90 % dans le rein après la naissance et dans le foie chez le fœtus. Elle est essentielle au déroulement de l'érythropoïèse et à la maturation des progéniteurs érythroïdes. Elle a été initialement découverte et purifiée à partir de quantités minimes se trouvant dans l'urine de patients atteints d'anémie aplasique (Miyake *et al.* 1977). L'Epo stimule la production des globules rouges et joue ainsi un rôle majeur dans le maintien de l'approvisionnement des tissus en oxygène. Son expression est finement régulée par un système sensible à la concentration en oxygène, à l'aide du facteur de transcription HIF1 (hypoxia-inducible factor 1) (Wang *et al.* 1993). HIF1 est un complexe protéique constitué de deux sous-unités, HIF-1 α et HIF-1 β . En état d'hypoxie (diminution du taux d'oxygène dans le sang) la sous-unité HIF-1 α est stabilisée et transloquée vers le noyau où elle se dimérise avec la sous-unité HIF-1 β . Le complexe transactive l'expression de différents gènes dont celui de l'Epo (Maxwell *et al.* 1993; Ebert *et al.* 1999). Une fois l'Epo synthétisée, elle est libérée dans la circulation sanguine pour atteindre les érythroblastes qui résident dans la moelle osseuse. Au niveau de la moelle osseuse ce facteur se fixe sur les récepteurs de l'Epo (REpo) des progéniteurs érythroïdes et stimule leur maturation et leur prolifération. Les cellules qui expriment REpo et qui sont susceptibles de répondre à l'Epo vont du stade BFU-E au stade des érythroblastes basophiles (Figure 9). La quantité de globules rouges capables de transférer de l'oxygène est par conséquent augmentée. Le taux d'oxygène apporté aux tissus est ainsi corrigé (normoxie) (Figure 11).

L'Epo joue un rôle dans la différenciation, la prolifération et l'inhibition de la mort des cellules érythroïdes et il est de plus en plus évident qu'elle peut agir comme un cytoprotecteur sur des cellules non érythroïdes. De plus, elle est exprimée en faibles quantités par plusieurs tissus non hématopoïétiques comme le cerveau, le cœur, l'utérus, les îlots pancréatiques et l'intestin grêle (Chateauevieux *et al.* 2011).

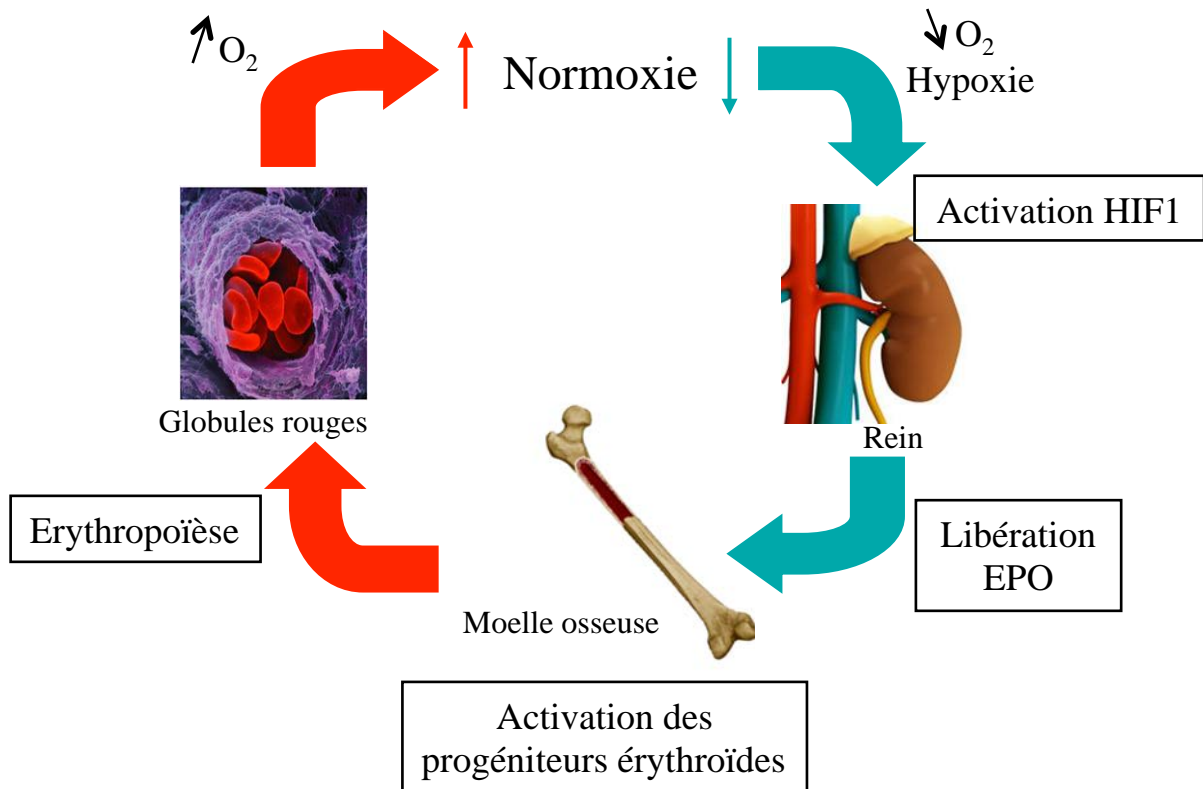


Figure 11 : Régulation de l'érythropoïèse

L'expression de l'érythropoïétine (Epo) est finement régulée en fonction de la concentration sanguine en oxygène (O_2). En état d'hypoxie, le facteur de transcription HIF1 (Hypoxia-inducible factor 1) est activé et induit l'expression du gène de l'Epo au niveau du rein. L'Epo ainsi libérée entre dans la circulation pour atteindre les progéniteurs érythroïdes qui résident dans la moelle osseuse. L'Epo se lie aux récepteurs membranaires présents sur les progéniteurs érythroïdes pour induire leur différenciation et leur maturation. Il y a par conséquent une augmentation de la production de globules rouges qui compense le manque d'oxygène.

1.5.5 Voies de signalisation induites par l'Epo

L'érythropoïèse est finement régulée par la balance entre la survie et la différenciation induites par des cytokines telle que l'Epo et des facteurs de croissance tel que le SCF, et l'apoptose induite par les ligands de récepteurs de mort tel que le récepteur du TNF et les cytokines. De même que pour l'interaction entre Epo et REpo, le SCF et son récepteur c-kit sont essentiels au déroulement normal de l'érythropoïèse, puisque des souris KO qui n'expriment pas ces gènes, meurent au stade embryonnaire avec une anémie sévère. Epo et SCF ont des actions synergiques sur les progéniteurs érythroblastiques en agissant sur leurs récepteurs REpo et c-kit qui sont exprimés très fortement par les BFU-E et les CFU-E (Socolovsky *et al.* 1998) (Figure 4 et Figure 9).

La liaison de l'Epo à son récepteur homodimérique REpo, induit le changement conformationnel du domaine extracellulaire qui entraîne l'activation par autophosphorylation de la kinase JAK2 (Janus Kinase 2) qui est pré-associée au récepteur. Le domaine cytoplasmique du récepteur contient des tyrosines qui sont phosphorylées par JAK2 et qui servent de site de liaison aux protéines activatrices de voies de signalisation comme par exemple la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K. Les voies de signalisation de JAK2/STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) (Socolovsky *et al.* 2001), PI3K (Phosphoinositide 3 Kinase)/AKT (Myklebust *et al.* 2002; Bouscary *et al.* 2003) et MAPK (Mitogen-activated protein kinase) (Carroll *et al.* 1991; Spivak 2005) sont ainsi activées (Figure 12). Ces voies de signalisation sont toutes impliquées dans la prolifération, la maturation et la différenciation des progéniteurs érythroïdes.

La voie JAK2/STAT5 favorise la survie des érythroblastes. STAT5 est un facteur de transcription séquestré dans le cytoplasme jusqu'à ce qu'il soit activé par phosphorylation par le REpo. Cette activation entraîne sa dimérisation et sa translocation vers le noyau pour activer l'expression de gènes cibles impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire. En plus de ces gènes, STAT5 active l'expression de gènes antiapoptotiques dans les cellules érythroïdes, notamment Bcl-xL (B cell lymphoma-extra large). Le rôle principal de Bcl-xL est le maintien de l'intégrité de la membrane mitochondriale par inhibition de la libération du cytochrome C. En conséquence, la caspase-3 qui entraîne l'apoptose est inhibée, ce qui conduit à la survie cellulaire. Ainsi, Bcl-xL est un régulateur antiapoptotique essentiel à la survie des érythroblastes permettant leur différenciation terminale (Wagner *et al.* 2000). Bcl-xL est

surexprimé aux stades précoces de l'érythropoïèse avec un pic au stade des érythroblastes polychromatophiles (Testa 2004).

La voie PI3K/AKT est impliquée dans la prolifération cellulaire (Bouscary *et al.* 2003). La PI3K est composée de deux sous-unités, la sous-unité catalytique ou p110 et la sous-unité régulatrice ou p85. Le recrutement de la PI3K au niveau du REpo se fait soit *via* la tyrosine Y479 soit par l'intermédiaire de protéines comportant des domaines SH2 (Src homology 2) comme par exemple Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) (Wojchowski *et al.* 1999). Grb2 en se liant à la tyrosine Y464 du REpo active indirectement PI3K *via* l'activation de RAS (Figure 12). Huddleston *et al.* ont démontré l'importance de cette voie dans l'érythropoïèse embryonnaire en utilisant des modèles murins déficients en sous-unité p85 de la PI3K (Huddleston *et al.* 2003). L'Epo induit la phosphorylation d'AKT dans les progéniteurs érythroïdes. L'activation de cette voie par l'Epo a déjà été étudiée dans les cellules CD34+. Plus précisément l'inhibiteur spécifique de PI3K, LY294002, bloque complètement les effets prolifératifs et différenciants de l'Epo dans les cellules CD34+ (Myklebust *et al.* 2002). De plus, une étude sur puce à ADN a démontré que l'Epo change le niveau d'expression de gènes régulés par PI3K, tel que la GPA et le récepteur du SCF (Sivertsen *et al.* 2006). Cette voie joue un rôle dans la régulation post-traductionnelle du principal facteur de la différenciation érythroïde, GATA-1. En effet, AKT une fois activé par l'Epo, phosphoryle GATA-1 au niveau de la sérine 310. GATA-1 ainsi phosphorylé est transloqué dans le noyau où il exerce son rôle de facteur de transcription en activant l'expression de gènes impliqués dans la différenciation érythroïde, comme les gènes des globines et dans la survie cellulaire, comme Bcl-xL (Zhao *et al.* 2006).

La voie des MAPK qui est constituée d'une cascade de kinases telles que RAS/RAF/MEK/ERK1/2, joue un rôle dans la différenciation érythroïde. L'activation de RAF-1 induit l'inhibition de la caspase-3 conduisant à l'arrêt du programme de différenciation. En effet, la caspase-3 joue un rôle dans la maturation des érythrocytes et leur différenciation terminale (Zermati *et al.* 2001; Kolbus *et al.* 2002). La MAPK p38 α reste inhibée pendant les stades précoces de la différenciation érythroïde (stades de dépendance aux facteurs de croissance SCF et Epo) et est activée/phosphorylée pendant la phase terminale indépendante de l'Epo et de SCF (Nagata *et al.* 1998; Uddin *et al.* 2004). Cette MAPK régule l'expression de TNF α dans les cellules CD34+ (Garcia *et al.* 1998). L'activation du TNF α par la p38 α provoque la phosphorylation de la Hsp27 (protéine de choc thermique 27) qui joue un rôle dans la stabilisation des filaments d'actine participant ainsi en fin de différenciation au processus de l'énucléation (Lavoie *et al.* 1993). Par conséquent le TNF α est exprimé en fin de différenciation érythroïde et la régule positivement. De plus, de Thonel *et al.* ont démontré que la

phosphorylation de Hsp27 par la MAPK p38 conduit à la dégradation par le protéasome de GATA-1 acétylé aux stades finaux du processus de la différenciation érythroïde (de Thonel *et al.* 2010). Au contraire, il a été démontré par Buck *et al.* que la phosphorylation rapide de cette MAPK par le TNF α conduit à l'inhibition de la différenciation érythroïde des cellules TF1 stimulées à l'Epo (Buck *et al.* 2008).

1.5.6 La survie et la mort des érythrocytes

L'Epo, en coopération avec GATA-1, induit directement ou indirectement l'expression de molécules anti-apoptotiques telle que Bcl-xL pour protéger les érythroblastes de l'apoptose (Gregory *et al.* 1999). L'Epo régule l'expression de Bcl-xL *via* l'inhibition des caspases (Mori *et al.* 2003) ainsi que par la voie JAK2/STAT5 (Socolovsky *et al.* 2001). GATA-1 est directement impliqué dans la transcription du gène de Bcl-xL (Gregory *et al.* 1999).

Le sevrage en Epo active l'apoptose des érythroblastes suite à l'activation de la caspase-3 (Gregoli *et al.* 1999) et le clivage de GATA-1 (De Maria *et al.* 1999). La caspase-3 est activée majoritairement dans les globules rouges en fin de vie (Berg *et al.* 2001). De plus, GATA-1 est clivé au stade terminal de la différenciation érythroblastique induite par l'Epo (Zermati *et al.* 2001; Carlile *et al.* 2004).

Ribeil *et al.* ont proposé un modèle expliquant le rôle de la protéine de choc thermique Hsp70 dans la protection de GATA-1 contre le clivage par la caspase-3 au cours de la différenciation des érythroblastes (Ribeil *et al.* 2007). D'après ce modèle, l'Epo permettrait le maintien de la localisation nucléaire d'Hsp70 et son interaction avec GATA-1. Ceci protégerait GATA-1 du clivage par la caspase-3. En l'absence d'Epo, Hsp70 est délocalisée vers le cytoplasme, la caspase-3 peut alors cliver GATA-1 et entraîne ainsi l'arrêt de la différenciation et l'apoptose des progéniteurs érythroblastiques.

Les globules rouges matures n'ont pas de machinerie apoptotique puisqu'ils ne possèdent pas de noyau (Weil *et al.* 1998). Paradoxalement en fin de vie ils deviennent sénescents et meurent par un processus similaire à celui de l'apoptose. Au cours de la sénescence la concentration en Ca²⁺ augmente, la calpaïne est activée ce qui conduit à la microvésiculation de la membrane plasmique et l'externalisation de résidus de phosphatidylsérine. Ultérieurement les cellules sont reconnues par les macrophages et détruites par phagocytose (Berg *et al.* 2001). L'activation de la caspase-3 provoque la dégradation de protéines responsables du maintien de la membrane plasmique (SLC4A1) et conduit ainsi à la mort précoce des globules rouges (Mandal *et al.* 2003).

Par opposition à son effet pro-apoptotique, la caspase-3 joue un rôle important dans la différenciation cellulaire sans induire la mort de la cellule. La caspase-3 participe à la maturation des kératinocytes et contribue à la perte de leurs noyaux en fin de différenciation (Weil *et al.* 1999). L'activation de la caspase-3 et -9 est indispensable à la formation des plaquettes dans la différenciation mégacaryocytaire (De Botton *et al.* 2002). Son inhibition bloque la maturation de monocytes en macrophages (Sordet *et al.* 2002). Au cours de la différenciation érythroïde, l'activation des caspases-3 et -7 est impliquée dans la perte de l'intégrité nucléaire en dégradant la lamine B et en provoquant la condensation de la chromatine sans pour autant déclencher l'apoptose des érythroblastes (Gregoli *et al.* 1999; Zermati *et al.* 2001; Carlile *et al.* 2004).

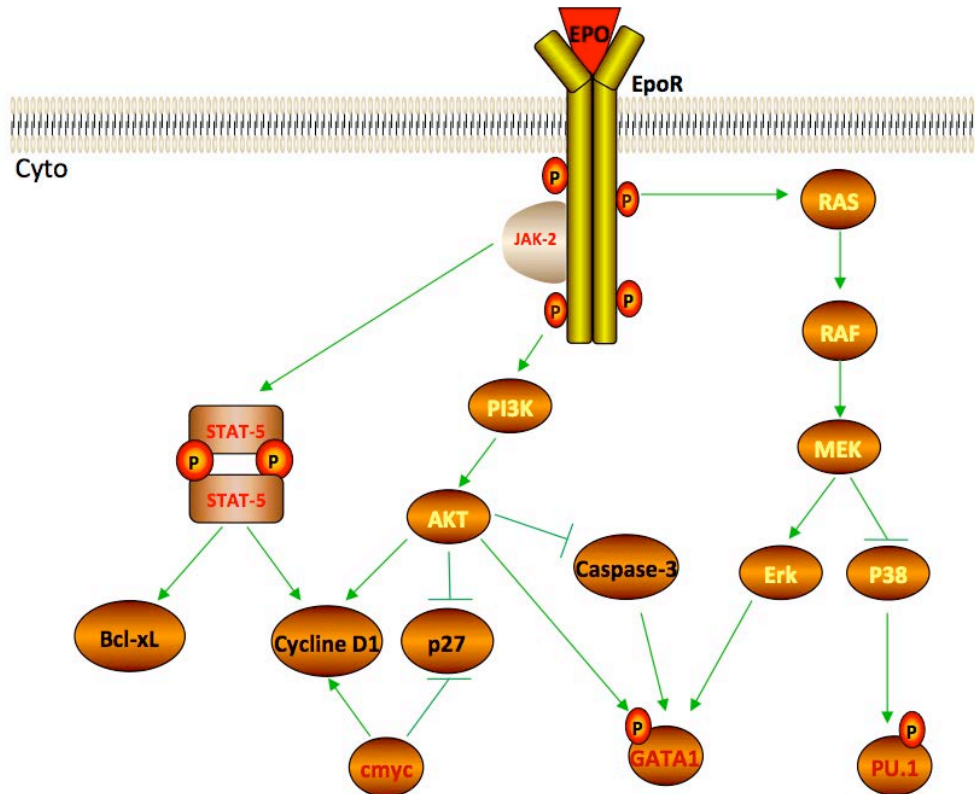


Figure 12 : Voies de signalisation activées par l'interaction entre l'Epo et son récepteur (REpo)

L'interaction de l'Epo avec son récepteur provoque l'autophosphorylation de la kinase JAK2 qui est pré-associée à la partie cytoplasmique du récepteur. JAK2 phosphoryle des tyrosines présentes à la partie cytoplasmique de REpo qui deviennent des sites de liaison de protéines activant différentes voies de signalisation. À la suite de ces événements les voies JAK2/STAT5, RAS/MAPK et PI3K/AKT sont activées. Le facteur STAT5 après son activation va migrer dans le noyau pour activer l'expression de Bcl-xL (B cell lymphoma-extra large), gène anti-apoptotique, important pour la survie des érythrocytes au cours de la différenciation érythroïde. La voie de PI3K/AKT inhibe la caspase-3 dans le but d'inhiber la mort cellulaire. De plus, en fin de différenciation la caspase-3 est activée pour dégrader GATA-1 et aider la fin de maturation des érythrocytes. La voie des MAPK conduit à la régulation de GATA-1, facteur essentiel de l'érythropoïèse. Ainsi l'Epo régule l'expression et l'activité de GATA-1.

1.6 Le facteur de transcription GATA-1

Les membres de la famille GATA appartiennent aux facteurs de transcription reconnaissant la séquence consensus (A/T)GATA(A/G) (Merika *et al.* 1993). Six membres de cette famille ont été isolés et caractérisés, de GATA-1 à GATA-6. GATA-1, -2 et -3 sont exprimés dans les lignées hématopoïétiques (Weiss *et al.* 1995). GATA-4, -5 et -6, sont exprimés par l'intestin, le poumon et le cœur (Molkentin 2000). Ces protéines contiennent deux motifs en doigts de Zinc dans leurs parties carboxy (C) et amino (N) terminale, et un domaine de transactivation N-terminal. Le motif en doigts de Zinc de la partie C-terminale est important pour la liaison du facteur à sa séquence consensus. Le doigt de Zinc situé dans la région N-terminale est essentiel pour assurer l'affinité du facteur avec l'ADN, mais aussi avec d'autres facteurs comme par exemple FOG (Friend of GATA)-1 (Whyatt *et al.* 1993). GATA-1 est le premier membre de la famille identifié (Evans *et al.* 1988). Il est localisé sur le chromosome Xp11.23 (Zon *et al.* 1990). Il est exprimé par les cellules souches hématopoïétiques mais également par les éosinophiles (Zon *et al.* 1993), les mégacaryocytes (Romeo *et al.* 1990) ainsi que par les mastocytes (Martin *et al.* 1990) et par les cellules de Sertoli des testicules de souris (Yomogida *et al.* 1994).

1.6.1 Rôles de GATA-1

GATA-1 et la différenciation

GATA-1 est un facteur de transcription qui joue un rôle primordial dans la différenciation érythroïde. Il active l'expression de gènes spécifiques de l'érythropoïèse comme les globines, les enzymes de biosynthèse de l'hème et des protéines membranaires comme le REpo et la glycophorine A (GPA) (Koury *et al.* 2002). L'indispensable rôle de GATA-1 dans le déroulement normal de l'érythropoïèse a été démontré par différentes études. L'observation des conséquences phénotypiques dues à l'absence de GATA-1, ou à des variations de son expression, montre clairement sa relation directe avec l'érythropoïèse. Ainsi des embryons murins KO meurent entre les stades E10.5 et E12.5 à la suite d'une anémie due à un blocage total de l'érythropoïèse embryonnaire (Fujiwara *et al.* 1996). De la même manière, des cellules souches embryonnaires GATA-1 *-/-* ne sont pas capables de réaliser une érythropoïèse complète (Pevny *et al.* 1991).

Des mutations localisées sur les séquences d'ADN *cis*-régulatrices au niveau du promoteur des gènes cibles de GATA-1 ont été décrites. Ces mutations concernent le plus souvent des nucléotides qui se trouvent au niveau des séquences consensus de GATA-1 (Ohneda *et al.* 2002). Elles ont pour conséquence la fixation alternée de GATA-1 sur l'ADN. Les maladies associées sont en relation avec différents types d'anémie soulignant le rôle de GATA-1 dans l'érythropoïèse (Tableau 1).

L'importance de GATA-1 dans l'érythropoïèse et la mégacaryopoïèse est approuvée puisque des mutations héréditaires ont été retrouvées chez des familles phénotypiquement caractérisées par une thrombocytopénie et/ou une anémie plus ou moins sévère. Ce sont des mutations ponctuelles faux-sens, c'est à dire qu'il y a remplacement d'un codon spécifiant un acide aminé par un codon qui en spécifie un autre. Dans le cas de GATA-1 elles n'affectent pas le cadre de lecture. Ces mutations sont représentées par V205M (Nichols *et al.* 2000), D218G (Freson *et al.* 2001), D218Y (Freson *et al.* 2002), G208S (Mehaffey *et al.* 2001), G208R (Del Vecchio *et al.* 2005), R216Q (Yu *et al.* 2002; Balduini *et al.* 2004) et R216W (Phillips *et al.* 2007) et sont regroupées dans la partie du doigt de Zinc au niveau N-terminal de GATA-1. La majorité de ces mutations n'affecte pas la capacité de GATA-1 à se lier à l'ADN, mais interrompe son interaction avec son cofacteur FOG1 (Tableau 2). La gravité de la thrombocytopénie est liée au degré d'affection de l'interaction entre les deux facteurs. Néanmoins, les patients porteurs de la mutation R216Q présentent une thrombocytopénie accompagnée de β -thalassémie. Cette mutation n'affecte pas l'interaction GATA-1/FOG1, mais surtout la liaison de GATA-1 avec des séquences palindromiques au niveau de l'ADN (Yu *et al.* 2002; Balduini *et al.* 2004). La glycine 208 peut aussi être remplacée par une arginine. Cette mutation (G208R) a été corrélée non seulement avec une dysérythropoïèse, mais également avec une thrombocytopénie (Del Vecchio *et al.* 2005). L'effet de la substitution de l'acide aminé 208 sur la fonction de GATA-1 concerne aussi bien le développement mégacaryocytaire que le développement érythroïde.

Li *et al.* ont proposé un modèle concernant la leucémie mégacaryoblastique aiguë (LMKA) corrélée à la trisomie 21. Ce modèle suggère que la population transitoire de progéniteurs hématopoïétiques extraembryonnaires (hématopoïèse primitive) et intraembryonnaires (hématopoïèse définitive) est sensible à des mutations spontanées qui provoquent la synthèse de GATA-1 tronqué (GATA-1s). Les progéniteurs contenant GATA-1s, associés à un profil génétique caractérisé par une trisomie 21, sont hyperprolifératifs, ce qui conduit à un syndrome myéloprolifératif transitoire (SMT). Les individus trisomiques sont donc plus susceptibles de développer une LMKA (Li *et al.* 2005). Ceci pourrait s'expliquer par le fait

que plusieurs régulateurs hématopoïétiques, comme ETS2 (Erythroblastosis virus E26 oncogene homologue 2) et Runx1, sont localisés sur le chromosome 21. La surexpression de ces facteurs chez les patients trisomiques, en corrélation avec les mutations de GATA-1, conduit à la production de complexes protéiques anormaux et l'apparition de LMKA. Par exemple, l'interaction de la région N-terminale de GATA-1 avec Runx1 est probablement interrompue dans des cellules leucémiques (Elagib *et al.* 2003).

En conclusion, les mutations héréditaires ou acquises de GATA-1 jouent un rôle important dans l'apparition de LMKA ou d'érythroleucémies, GATA-1 étant essentiel pour l'érythropoïèse ainsi que pour la mégacaryopoïèse.

Tableau 1: Mutations des séquences consensus de GATA-1 dans ses gènes cibles

Mutation	Gène cible	Fixation GATA1/ADN	Maladie associée	Référence
+69G>A	globine δ	Augmentée	δ -thalassémie	(Moi <i>et al.</i> 1992)
-77T>C		Supprimée		(Matsuda <i>et al.</i> 1992)
-133C>G	GP1b-IX-V	Supprimée	syndrome Bernard-Soulier	(Ludlow <i>et al.</i> 1996)
-72A>G	PKLR	Non testé	Anémie déficiente en Pyruvate Kinase	(Manco <i>et al.</i> 2000)
-70T>C	synthase d'uroporphyrinogène III	Supprimée	Porphyrie érythropoïétique congénitale	(Solis <i>et al.</i> 2001)
-76G>A		Inchangée		
-576T>G	globine γ	Augmentée	HPFH	(Chen <i>et al.</i> 2008)
-175T>C				(Liu <i>et al.</i> 2005)
-173T>C			β -thalassémie	(Papachatzopoulou <i>et al.</i> 2007)
+179C>T				

Tableau 2 : Mutations de GATA-1 et liaison GATA1/FOG1

Mutation	Liaison GATA1/FOG1	Maladie associée	Référence
V205M	Très réduite	Thrombocytopénie et anémie	(Nichols <i>et al.</i> 2000)
G208R	Très réduite	Thrombocytopénie et anémie	(Del Vecchio <i>et al.</i> 2005)
G208S	Réduite	Thrombocytopénie	(Mehaffey <i>et al.</i> 2001)
D218G	Réduite	Thrombocytopénie	(Freson <i>et al.</i> 2001)
D218Y	Très réduite	Thrombocytopénie et anémie	(Freson <i>et al.</i> 2002)
R216Q	Normale	Thrombocytopénie et β -thalassémie	(Yu <i>et al.</i> 2002; Balduini <i>et al.</i> 2004)
R216W	Non étudié	Thrombocytopénie et anémie	(Phillips <i>et al.</i> 2007)

GATA-1 et la survie cellulaire

GATA-1 est directement impliqué dans la survie cellulaire. Ce rôle a été démontré par des études indiquant que GATA-1 active la transcription du récepteur de l'EPO (REpo) (Chiba *et al.* 1991). Les signaux activés par la liaison de l'EPO sur son récepteur sont importants pour la survie des progéniteurs érythroïdes (Spivak 2005). En outre un des gènes cibles de GATA-1, Bcl-xL, code pour une protéine anti-apoptotique (Spivak 2005). Une autre action potentielle de GATA-1 est la régulation de la progression en G1/S du cycle cellulaire. Une analyse par micropuces menée dans des cellules G1E-ER dans lesquelles l'activité de GATA-1 est inductible par les estrogènes, a montré la régulation directe ou indirecte de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire. Les gènes de la Cycline D2 et Cdk6 sont réprimés par GATA-1, et les inhibiteurs des CDKs, p18^{INK4C} et p27^{Kip1} sont régulés positivement par GATA-1. Les auteurs ont identifié que le gène c-Myc était régulé négativement. C-Myc code pour une protéine aux propriétés mitogéniques. Son promoteur contient la séquence consensus de GATA-1 et son expression est directement réprimée par lui. Par conséquent la régulation des gènes impliqués dans la phase du cycle G1/S est réalisée indirectement par GATA-1 *via* c-Myc (Whyatt *et al.* 1997; Rylski *et al.* 2003). De plus, GATA-1 avec l'aide de Sp1 permet l'aboutissement de la différenciation érythroïde en induisant l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 indépendamment de p53 (Papetti *et al.* 2010).

1.6.2 Régulation de l'expression de GATA-1

Au niveau transcriptionnel

Chez la souris, le gène de GATA-1 est composé de six exons, de I à VI. La transcription du premier exon est dépendante du tissu, l'exon spécifique du tissu testiculaire nommé IT est transcrit dans les cellules de Sertoli alors que l'exon utilisé par les cellules hématopoïétiques est l'exon IE (Ito *et al.* 1993). Les cinq autres exons de II à VI, sont toujours transcrits (Tsai *et al.* 1991). La séquence primaire des deux doigts de Zinc est très conservée entre les espèces humaines et murines. Le reste de la séquence des ARNm est à 83% identique entre les deux espèces (Zon *et al.* 1990).

La régulation transcriptionnelle de GATA-1 dans les cellules hématopoïétiques dépend de

la présence de régions comme la boîte CACCC qui est reconnue par des facteurs de transcription de la famille Sp1/KLF (Sp/Kruppel-like Factor) et un site contenant deux séquences consensus GATA, qui sont situées à côté de l'exon IE (Nicolis *et al.* 1991; Tsai *et al.* 1991).

La présence des séquences consensus GATA suggère que les facteurs GATA peuvent jouer un rôle très important dans la régulation de GATA-1 pendant l'érythropoïèse. Par exemple le facteur GATA-2 a été proposé comme un régulateur négatif de l'expression de GATA-1 car son expression ne coexiste pas avec celle de GATA-1 pendant les stades primaires de la différenciation érythroïde (Burch 2005; Shimizu *et al.* 2005). De plus Tsai *et al.* ont proposé que GATA-1 peut se fixer sur son propre promoteur et activer son expression (Tsai *et al.* 1991). Cependant d'autres facteurs peuvent se lier au promoteur de GATA-1, comme Lmo2, EKLF, SCL et E2A et réguler son expression (Wadman *et al.* 1997; Kaczynski *et al.* 2003).

L'expression de GATA-1 varie pendant le processus de différenciation érythroïde et est très finement régulée. La variation de l'expression de GATA-1 conduit à la reprogrammation des progéniteurs vers d'autres voies de différenciation que l'érythropoïèse, comme par exemple la mégacaryopoïèse (Kobayashi *et al.* 2007).

Au niveau traductionnel

L'ARNm de GATA-1 possède deux sites d'initiation de la traduction représentés par la méthionine 1 et la méthionine 84 de la partie N-terminale de la séquence codante qui donnent naissance à deux protéines : GATA-1 (47 KDa) et la forme tronquée de GATA-1 (GATA-1s pour short, 40 KDa) (Calligaris *et al.* 1995). La protéine GATA-1s ne possède pas le domaine de transactivation, elle est donc moins active que GATA-1. En revanche sa capacité à se lier à l'ADN n'est pas affectée. GATA-1 et GATA-1s sont co-exprimés dans les cellules hématopoïétiques. L'activité transcriptionnelle des complexes GATA-1 peut ainsi varier en modulant le ratio des deux isoformes au cours du développement (Calligaris *et al.* 1995; Crossley *et al.* 1995).

Les fonctions de GATA-1s et de GATA-1, ainsi que leur corrélation avec le processus de l'hématopoïèse, sont peu connues. Les souris portant une mutation qui conduit à la surexpression de la forme GATA-1s présentent un développement normal de l'ensemble des lignées hématopoïétiques. La forme GATA-1s peut donc compenser la perte de GATA-1 et assurer la production des érythrocytes, des granulocytes et des mégacaryocytes chez la souris (Li *et al.* 2005). Cependant Majewski *et al.* ont montré que des souris mâles portant GATA-1

muté au niveau du site d'initiation de la traduction, similaires aux mutations présentes chez les patients atteints de SMT ou LMKA liée à une trisomie 21, mouraient d'une anémie sévère avant la naissance. Les femelles qui portent cette mutation par lyonisation (inactivation d'un des deux chromosomes X) présentent une interruption de la maturation des mégacaryocytes conduisant ainsi à une thrombocytopénie (Majewski *et al.* 2006).

Au contraire Hollanda *et al.* ont découvert une famille dont les mâles portent la mutation 322G>C au niveau de l'exon 2, qui a comme conséquence la synthèse de GATA-1s à la suite d'un épissage alternatif. Phénotypiquement les patients sont anémiques sans avoir de signes de thrombocytopénie. Au niveau de leur moelle osseuse, la maturation des érythrocytes est bloquée, et les mégacaryocytes sont dysplasiques et peu prolifératifs. La granulopoïèse peut également être affectée. Chez l'homme, la présence de la forme GATA-1s ne peut donc pas compenser la fonction de GATA-1 (Hollanda *et al.* 2006).

1.6.3 Régulation de l'activité de GATA-1

Modifications post-traductionnelles

La régulation post-traductionnelle de GATA-1 fait l'objet de nombreuses études mais le rôle exact de sa phosphorylation (Kadri *et al.* 2005; Zhao *et al.* 2006), de son acétylation (Hung *et al.* 1999; Hernandez-Hernandez *et al.* 2006), de sa sumoylation (Collavin *et al.* 2004) et de son interaction avec d'autres facteurs (Hung *et al.* 1999) n'est pas toujours clairement établie (Figure 13).

I. **Phosphorylation** : GATA-1 peut être phosphorylé au niveau de sept sérines : S26, S49, S72, S142, S178, S187 et S310. Partington *et al.* ont suggéré que la phosphorylation de GATA-1 est requise pour sa liaison à l'ADN. De plus, ils ont associé le rôle différenciant de GATA-1 avec les variations de son profil de phosphorylation (Partington *et al.* 1999). Zhao *et al.* ainsi que Kadri *et al.*, ont démontré que GATA-1 active l'expression de ses gènes cibles une fois phosphorylé au niveau de résidus sérine par la voie PI3K/AKT induite par l'Epo (Kadri *et al.* 2005; Zhao *et al.* 2006). GATA-1 est également phosphorylé par la voie des MAPK, au niveau des sérines 26 et 178, mais le rôle de cette phosphorylation n'a pas été établie (Towatari *et al.* 2004). Hernandez-Hernandez *et al.* ont affirmé que la phosphorylation de GATA-1 correspond à un signal qui conduit à sa dégradation par le protéasome (Hernandez-Hernandez *et al.* 2006).

Il faut également envisager la possibilité que les variations de phosphorylation de GATA-1 pourraient moduler ses interactions avec d'autres protéines. Par conséquent l'activité transcriptionnelle dépendra du contexte et des acteurs constituant les complexes au cours de la différenciation.

II. **Acétylation** : GATA-1 peut être acétylé au niveau de régions riches en lysines. Ces régions se localisent dans la partie C-terminale des deux motifs en doigt de Zinc. La première s'étend des acides aminés 245 à 252, et la deuxième de 308 à 316. Bien que l'action de l'acétylation sur son activité transcriptionnelle ne soit pas encore bien élucidée, GATA-1 est supposé être acétylé par l'acétyltransférase p300 du complexe CBP (CREB-binding protein)/p300 (Hung *et al.* 1999). L'acétylation s'avère nécessaire pour la liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle de GATA-1 (Boyes *et al.* 1998; Lamonica *et al.* 2006).

III. **Ubiquitination et dégradation** : L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle qui comporte plusieurs étapes avant d'aboutir à la fixation covalente d'une ou de plusieurs protéines d'ubiquitine (8 KDa) sur une ou plusieurs lysines acceptrices de la protéine. Ces modifications induisent principalement la dégradation de la protéine ubiquitinée par le protéasome. La dégradation de GATA-1 peut se faire soit par le protéasome (Hernandez-Hernandez *et al.* 2006) soit par la voie des caspases (De Maria *et al.* 1999; Ribeil *et al.* 2007). Dans un cas Hernandez-Hernandez *et al.* affirment que la phosphorylation de GATA-1 correspond à un signal d'ubiquitination et de dégradation par le protéasome. Dans l'autre cas, GATA-1 se trouve couplé à Hsp70 au niveau du noyau et l'absence d'Epo conduit à la rupture du complexe et la dégradation de GATA-1 par la caspase-3.

IV. **Sumoylation** : La sumoylation consiste à ajouter un peptide sur des résidus de lysine d'une protéine cible. Ce processus ressemble à celui de l'ubiquitination, mais au lieu d'entraîner la dégradation de la protéine ciblée par le protéasome, elle régule les propriétés biochimiques des protéines cibles (trafic intracellulaire, interaction protéique, interaction ADN-protéine et activité transcriptionnelle). Cette modification post-traductionnelle est associée avec la répression de l'activité transcriptionnelle (Sapetschnig *et al.* 2002). Concernant GATA-1 murin, il existe un site réceptif de sumoylation, la lysine K137 (Collavin *et al.* 2004). A ce jour, l'importance de cette modification sur les propriétés de GATA-1 n'est pas encore clairement élucidée.

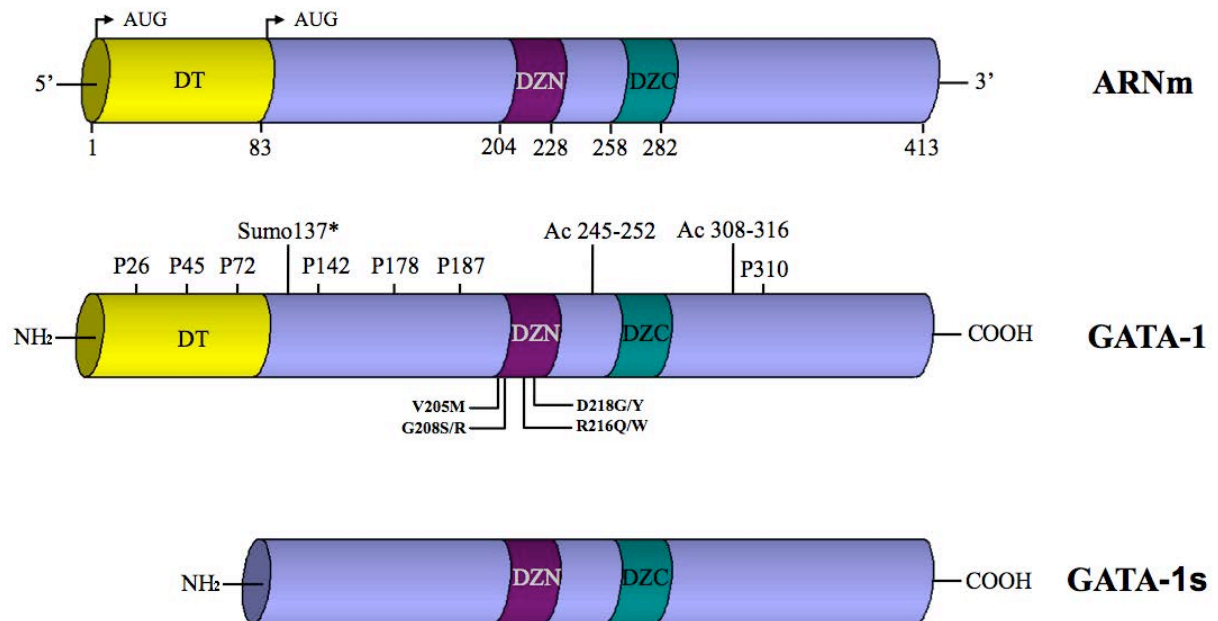


Figure 13: Modifications post-traductionnelles et mutations héréditaires de GATA-

1

DT : domaine de transactivation ; DZN : doigt de Zinc N-terminal ; DZC : doigt de Zinc C-terminal ; P : phosphorylation ; Sumo : sumoylation ; Ac : Acétylation ; * : l'astérisque indique la présence de sumoylation chez la souris.

Interaction de GATA-1 avec d'autres protéines

GATA-1 interagit avec différents co-facteurs ou autres facteurs de transcription. Ces interactions conduisent soit à l'activation, soit à la répression de l'expression des gènes cibles pendant la différenciation érythroïde (Morceau *et al.* 2004). Les paragraphes qui suivent présentent les principaux cofacteurs de GATA-1.

FOG1 (Friend of GATA)1 (Tsang *et al.* 1997; Liew *et al.* 2005) : FOG1 est une protéine à 9 doigt de Zinc. Elle interagit avec la partie N-terminal de GATA-1 (Tsang *et al.* 1997). L'interaction GATA-1/FOG1 est essentielle pour le déroulement normal de l'érythropoïèse ainsi que celui de la mégacaryopoïèse. Les souris « null » pour FOG meurent au stade embryonnaire d'une anémie sévère, comme pour les souris GATA-1 « null », suggérant ainsi que leur interaction est importante pour une érythropoïèse normale (Tsang *et al.* 1998). Il existe des mutations héréditaires de GATA-1 qui empêchent cette interaction (Tableau 2), comme par exemple la V205M et la G208S qui conduisent à des maladies hématologiques. Les personnes porteuses de la mutation V205M présentent une thrombocytopénie sévère accompagnée d'anémie. Des études menées chez des souris porteuses d'un allèle muté V205G ont montré que la valine 205 est importante pour l'interaction GATA-1/FOG1 (Crispino *et al.* 1999). La mutation D218Y réduit de manière importante l'interaction GATA-1/FOG1, et conduit à une thrombocytopénie aiguë, une sévère anémie et une augmentation de la mortalité précoce (Freson *et al.* 2002). En revanche les mutations D218G et G208S sont moins graves puisqu'elles affectent moins la liaison entre les deux facteurs. En effet, la mutation D218G est accompagnée de faible dysérythropoïèse sans présence d'anémie. La mutation G208S quant à elle, n'affecte pas la lignée érythropoïétique. Un cas portant la mutation R216W a été corrélé avec une thrombocytopénie et une porphyrie érythropoïétique congénitale (Phillips *et al.* 2007).

CBP/p300 : Blobel *et al.* ont découvert que GATA-1 interagit avec CBP, par immunoprécipitation d'extraits nucléaires de cellules érythroïdes (Blobel *et al.* 1998). De plus la fonction acétyltransférase de CBP/p300 acétyle GATA-1 permettant ainsi sa fixation à l'ADN, ainsi que la stimulation de son activité transcriptionnelle.

EKLF (erythroid Kruppel-like protein) : EKLF est un facteur de transcription qui permet l'expression du REpo. Il est impliqué dans l'expression des globines α et β , mais également dans la transition de l'expression de la globine γ fœtale à la globine β adulte (Kotkow *et al.* 1995; Wijgerde *et al.* 1996). EKLF stimule l'activation de GATA-1 en interagissant avec lui pour induire la différenciation érythroïde (Gregory *et al.* 1996).

Lmo2 (Lim only protein2)/Tal1/E2A : Lmo2 est une autre protéine à doigt de Zinc qui interagit avec GATA-1 en combinaison avec Tal1 et E2F, pour activer la transcription des gènes érythroïdes cibles. Elle établit la connexion entre GATA-1 et Tal1, ce dernier n'interagissant pas directement avec GATA-1 (Wadman *et al.* 1997).

Ikaros : Ikaros est un facteur de transcription qui contient des doigts de Zinc et qui appartient à une famille constituée de six isoformes (IK1 à IK6) (Molnar *et al.* 1994). Ce facteur a tout d'abord été impliqué dans le développement de la lignée lymphoïde, puisqu'il régule l'expression de gènes comme le TCR-CD3 (récepteur CD3 de cellule-T) (Georgopoulos *et al.* 1992). Par ailleurs, des études menées sur des souris transgéniques ont montré que la mutation de *Ikaros*, qui conduit à son incapacité à se fixer sur l'ADN, affecte le développement des lymphocytes B et T matures ainsi que leur progéniteurs et les cellules NK (Georgopoulos *et al.* 1994; Nichogiannopoulou *et al.* 1999)

Ikaros a également été impliqué dans l'engagement des CSH vers la différenciation érythroïde. L'expression d'un dominant négatif de Ikaros (IK6), dans des cellules progénitrices CD34+, provoque la mort cellulaire, la diminution de l'expression de gènes érythro-spécifiques incluant GATA-1, des globines fœtales et adultes, et finalement une augmentation de l'expression du facteur, PU.1 (Dijon *et al.* 2008).

Récemment, en 2009, Bottardi *et al.* ont démontré l'interaction physique GATA-1/Ikaros pour l'inhibition de l'expression de la globine γ , ainsi que pour la répression de GATA-2 pendant l'érythropoïèse primitive (Bottardi *et al.* 2009).

1.6.4 Rôle de l'interaction entre GATA-1 et PU.1 dans l'hématopoïèse

PU.1 fait partie des facteurs de transcription de la famille Ets. Il est exprimé par les lymphocytes B, les granulocytes et les monocytes et est important pour l'auto-renouvellement et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques. PU.1 est ainsi considéré comme un facteur-clé du développement des lignées lymphoïdes et monogranulocytiques (Figure 5). Dans la voie myéloïde, PU.1 est exprimé dans les lignées qui produisent les granulocytes et les macrophages alors qu'il doit être absent dans les lignées érythroïdes et mégacaryocytaires (Mak *et al.* 2011). Son niveau d'expression est régulé de manière dynamique au sein de l'hématopoïèse afin d'orienter les CSH vers l'une ou l'autre des voies de différenciation hématopoïétiques. Différents modèles de souris KO ont permis de démontrer l'importance de PU.1 dans la myélopoïèse. En effet, la suppression de PU.1 entraîne l'absence des progéniteurs myéloïdes, ainsi que des granulocytes, des neutrophiles et des macrophages matures (Scott *et al.* 1994; McKercher *et al.* 1996; Iwasaki *et al.* 2005; DeKoter *et al.* 2007; Houston *et al.* 2007). Le contrôle du niveau d'expression de PU.1, grâce à des modèles de cellules myéloïdes transgéniques, a révélé qu'un bas niveau d'expression de PU.1 activait à la fois des gènes spécifiques des macrophages et des neutrophiles (Laslo *et al.* 2006). Au contraire, lorsque le niveau d'expression de PU.1 atteint un seuil élevé, il en résulte une induction de l'expression du facteur de transcription Egr (early growth response)-2 et du répresseur transcriptionnel Nab-2 (NGFIA-binding protein 2), spécifiques de la lignée granulo-monocytaire. Ces facteurs coopèrent pour réprimer l'expression du facteur de transcription Gfi (growth factor independent)-1, qui régule les gènes spécifiques des neutrophiles. La différenciation des neutrophiles est ainsi inhibée alors que la différenciation des macrophages est activée (Laslo *et al.* 2006; Spooner *et al.* 2009). Ainsi, PU.1 inhibe indirectement l'expression de Gfi-1. En fait, Gfi-1 et PU.1 se répriment mutuellement dans le but d'orienter les progéniteurs vers la voie des neutrophiles ou des macrophages (Spooner *et al.* 2009). Les travaux de Dahl *et al.*, ont permis de déduire que dans le cas d'un faible niveau d'expression de PU.1 dans les progéniteurs granulo-monocytiques, l'expression des facteurs pro-neutrophiles Gfi-1 et C/EBP α est suffisante pour réprimer la fonction de PU.1 en inhibant les gènes spécifiques des macrophages et en induisant la différenciation des neutrophiles (Dahl *et al.* 2003).

En plus de son rôle important dans la myélopoïèse, PU.1 est impliqué dans la régulation de la lymphopoïèse. Les souris mutées pour PU.1 sont déficientes en cellules T et B (McKercher *et al.* 1996). Les données basées sur les études d'expression de PU.1 dans des souris ont montré

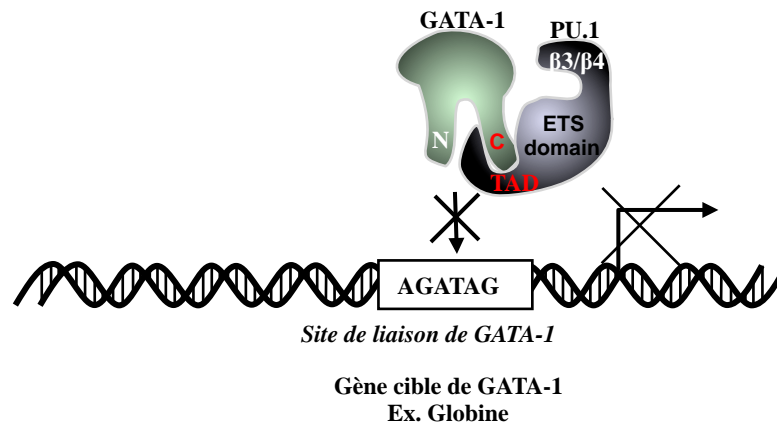
que l'expression de PU.1 augmente au cours de la différenciation vers des lymphocytes B (Polli et al. 2005) alors qu'elle diminue dans les lymphocytes T (Anderson et al. 2002). La délétion de PU.1 chez des souris après le stade de pré-B ne perturbe pas la production de l'expression d'immunoglobuline. PU.1 est donc indispensable pour le développement des cellules B mais pas pour leur maturation terminale (Iwasaki *et al.* 2005). De même que pour les cellules B, PU.1 est important pour les stades précoces du développement des cellules T. Une fois que les cellules sont engagées dans la voie de la différenciation des cellules T, l'expression de PU.1 chute. Une surexpression de PU.1 conduit à l'arrêt de la prolifération et au blockage de la maturation des cellules T. La diminution donc de l'expression de PU.1 est indispensable pour la maturation des cellules T (Anderson *et al.* 2002).

Dans la lignée érythroïde, le rôle inhibiteur de PU.1 a été décrit par un mécanisme qui implique le facteur GATA-1. Contrairement à FOG1, p300/CBP, EKLF et Lmo2 qui sont des co-activateurs de GATA-1, PU.1 interagit directement avec GATA-1 en empêchant sa fixation à l'ADN, ce qui entraîne une inhibition de son activité transcriptionnelle (Yamada *et al.* 1998; Zhang *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2000; Rekhtman *et al.* 2003). Ces deux facteurs s'inhibent mutuellement en empêchant leurs activités transcriptionnelles respectives et en conduisant les progéniteurs myéloïdes vers la voie érythroïde ou vers la voie myéloïde (Rekhtman *et al.* 1999; Rekhtman *et al.* 2003). Les mécanismes par lesquels ces deux facteurs agissent sont différents. D'une part, en se liant au doigt de zinc de la région C-terminale de GATA-1 par sa région trans-activatrice N-terminale, PU.1 inhibe la liaison de GATA-1 à l'ADN et donc l'activation de ses gènes cibles comme les globines. D'autre part, le doigt de zinc de la région C-terminale de GATA-1 peut aussi interagir avec la région $\beta 3/\beta 4$ de la protéine PU.1 pour entrer en compétition avec c-jun, un co-facteur de PU.1. Cette interaction entraîne l'inhibition de l'activité de PU.1 et affecte l'expression de ses gènes cibles comme le CD11b (Zhang *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2000) (Figure 14).

Le niveau d'expression de PU.1 est donc important puisqu'il existe une relation stœchiométrique qui gouverne son interaction avec les différents facteurs impliqués dans l'hématopoïèse. Le dérèglement de son expression (Rosenbauer *et al.* 2004) ou la présence de mutations (Mueller *et al.* 2002; Suraweera *et al.* 2005) conduisent à des transformations oncogéniques comme des leucémies aiguë myéloblastiques (LAM) et des lymphomes (Moreau-Gachelin *et al.* 1996; Burda *et al.* 2010). Il est à noter que des mutations dirigées dans les régions protéiques de GATA-1 et de PU.1 impliquées dans leur liaison n'ont pas permis d'inhiber leur interaction (Liew *et al.* 2006). L'analyse des immunoprécipitations de la chromatine ont permis de mettre en évidence que PU.1 régule l'expression de gènes érythroïdes

ainsi que l'expression de différents acteurs qui participent aux voies de signalisation comme les voies PI3K/AKT et JAK2/STAT5, importantes pour la prolifération et la survie des progéniteurs hématopoïétiques (Wontakal *et al.* 2011).

A.



B.

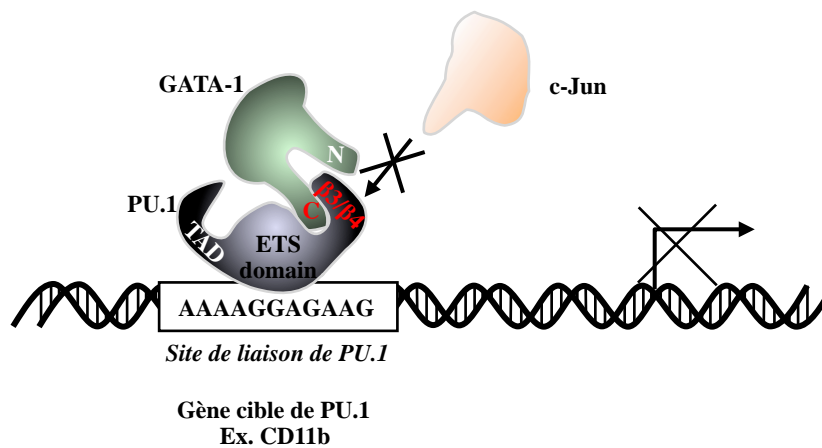


Figure 14 : Interaction entre GATA-1 et PU.1

GATA-1 et PU.1 sont deux facteurs de transcription qui s'inhibent mutuellement par des mécanismes différents, empêchant leur activité transcriptionnelle. Les interactions protéine-protéine engagées entre les deux facteurs peuvent être de natures différentes.

A. La région N-terminale de PU.1 (TAD, Transactivation Domain) se lie au doigt de zinc de la région C-terminale (C) de GATA-1 bloquant ainsi la liaison de GATA-1 à son site ADN et provoquant une inhibition de l'expression des gènes cibles de GATA-1.

B. Le doigt de zinc de la région C-terminale (C) de GATA-1 se lie à la région $\beta 3/\beta 4$ de PU.1 et agit comme un compétiteur de c-Jun, co-activateur de PU.1. Ceci entraîne une inhibition de l'expression des gènes cibles de PU.1. Adapté de (Zhang *et al.* 2000).

1.6.5 La balance GATA-1/GATA-2

GATA-1 et GATA-2 sont des facteurs de la même famille qui jouent en coopération, un rôle clé dans la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans la différenciation érythroïde (Anguita *et al.* 2004; Fujiwara *et al.* 2004). GATA-1 est important pour la survie des progéniteurs érythroïdes et la différenciation terminale (Pevny *et al.* 1991). GATA-2 est impliqué essentiellement dans l'auto-renouvellement et la prolifération des précurseurs hématopoïétiques au début du processus de l'érythropoïèse (Tsai *et al.* 1994) (Figure 15).

Un modèle a été proposé par Ferreira *et al.* pour la régulation dynamique de l'érythropoïèse par GATA-1 et GATA-2. Ce modèle repose sur le fait que GATA-2 active la transcription de son propre gène en recrutant sur son promoteur le facteur CBP qui induit l'acétylation des histones. Le remplacement de GATA-2 par GATA-1 a comme conséquence la désacétylation des histones du promoteur de GATA-2 et donc l'inhibition de sa transcription. Au début de la différenciation érythroïde, GATA-2 est acétylé par CBP/p300 et active l'expression de GATA-1 (Ohneda *et al.* 2002; Grass *et al.* 2003; Hayakawa *et al.* 2004). Puis GATA-1 à son tour inhibe l'expression de GATA-2 et autorégule sa propre expression (Ohneda *et al.* 2002; Grass *et al.* 2003). L'activation de l'expression de GATA-2 dans les progéniteurs hématopoïétiques se fait par autorégulation (Grass *et al.* 2003). La diminution progressive de GATA-1 pendant les derniers stades de la différenciation érythroïde est essentielle pour l'aboutissement de la différenciation, puisque les progéniteurs ayant des niveaux élevés de GATA-1 arrêtent de se différencier *in vitro* (Whyatt *et al.* 1997) et *in vivo* (Whyatt *et al.* 2000). Gutierrez *et al.* ont suggéré que les cellules en phase terminale de différenciation érythroïde produisent des ligands capables de se fixer aux récepteurs de mort se trouvant sur les cellules en arrêt de différenciation, et activent les caspases pour dégrader l'excès de GATA-1 afin de pouvoir continuer à se différencier (Gutierrez *et al.* 2004) (Figure 15). Il a été démontré par ailleurs que GATA-1 diminue aux stades tardifs de la différenciation, suite à sa dégradation par la caspase-3 (De Maria *et al.* 1999).

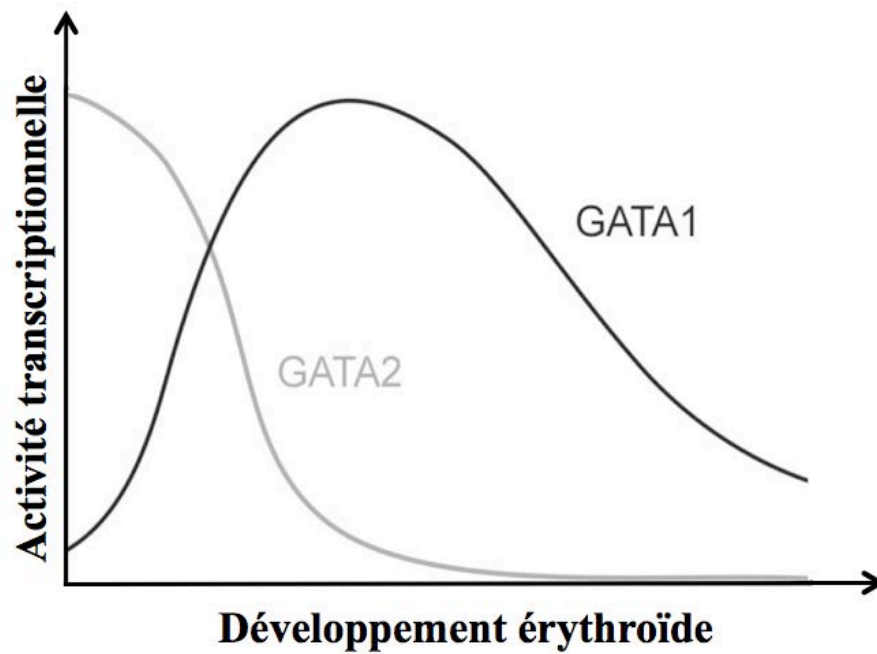


Figure 15 : Modèle de la régulation dynamique de GATA-1 et GATA-2 pendant l'érythropoïèse

GATA-2 est exprimé par des progéniteurs immatures. Quand GATA-1 est exprimé, il réprime l'expression de GATA-2. GATA-1 présente un pic d'expression aux stades CFU-E/proérythroblaste. A la fin de l'érythropoïèse son expression diminue à cause de sa dégradation par la caspase-3 (adapté de (Ferreira *et al.* 2007)).

1.6.6 Les micro-ARN

Lee *et al.* ont découvert que le gène *lin-4*, qui est important pour le développement larvaire de *C. Elegans*, ne code pas pour une protéine mais au contraire génère deux petits ARN. Ces ARN *lin-4* sont complémentaires au niveau de différents sites de la région 3'-non traduite (NT) de l'ARNm du gène *lin-14*, en réprimant sa traduction (Lee *et al.* 1993 ; Wightman *et al.* 1993).

Depuis cette découverte ces petits ARN régulateurs sont appelés micro-ARN (mi-ARN, ou miR). En général, le terme miR décrit ces petits ARN qui ne codent pas pour une protéine mais qui régulent l'expression des gènes en inhibant la traduction ou en déstabilisant les transcrits cibles. Le niveau d'expression des miR varie en fonction du type cellulaire et du tissu. Au contraire ils ne sont pas exprimés dans des organismes unicellulaires comme la levure.

L'organisation génomique des miR est hétérogène. Près de la moitié des miR se trouve dans des introns avec généralement la même orientation que le gène dans lequel ils sont inclus. Une partie est répartie dans des exons (10%) et des séquences Alu répétées (10%). Enfin, certains possèdent un promoteur indépendant (20%) et leurs gènes peuvent être organisés en «clusters».

La majorité des miR sont transcrits par la Polymérase II (Pol II), bien que ceux provenant des séquences répétées Alu soient transcrits par la Pol III (Lee *et al.* 2004).

La première étape de la biogenèse consiste en la transcription d'un miR primaire ou pri-miR (quelques centaines à quelques milliers de nucléotides) qui peut contenir des épingle à cheveux, une coiffe et une queue polyA. Ce pri-miR est clivé dans le noyau par l'endonucléase Drosha Pol III à la base de l'épingle à cheveux. Le clivage du pri-miR par la Drosha donne naissance au précurseur du miR (pré-miR), d'une longueur d'environ 70 nucléotides et est constitué par l'épingle à cheveux (Lee *et al.* 2003). Par la suite le pré-miR est exporté dans le cytoplasme par la Ran-GTP et l'exportine 5 (Yi *et al.* 2003; Lund *et al.* 2004). Au niveau du cytoplasme une autre endonucléase de type III possédant un domaine hélicase, nommée DICER, coupe l'épingle à cheveux de sa base en libérant un complexe transitoire de si-ARN double brin. Ces complexes sont instables et donnent rapidement naissance à des miR matures (simple brin) de 21 nucléotides environ. Finalement le miR mature est incorporé au complexe ribonucléoprotéique RISC (RNA-Induced Silencing Complex) qui le conduit vers la région 3' de l'ARNm cible en réprimant sa traduction ou en le déstabilisant, notamment par clivage de la

queue poly-Adénylée (poly-A) (Ambros 2004; Meister *et al.* 2004; Du *et al.* 2005; Hammond 2005; Kim *et al.* 2006).

La spécificité des miR est dépendante des nucléotides 2 à 8 du côté 5' du miR. Ces premiers nucléotides sont responsables de l'appariement efficace et de la reconnaissance de l'ARNm cible. Ils sont hautement conservés dans l'évolution et sont utilisés pour la prédiction des gènes cibles (Lewis *et al.* 2003; Lewis *et al.* 2005). De ce fait un miR donné peut avoir plusieurs cibles grâce à cette séquence de complémentarité restreinte en 5'. A l'opposé un gène peut posséder plus d'un site de reconnaissance dans sa région 3'.

Le rôle des miR est de mieux en mieux connu. Ils sont impliqués dans la régulation de différents mécanismes cellulaires comme le développement, la prolifération, la mort et la différenciation cellulaire, et notamment l'hématopoïèse. Par ailleurs, ils peuvent également collaborer avec des facteurs de transcription afin de réguler des gènes cibles et contrôler ainsi le phénotype et l'identité cellulaire (Hobert 2004). Le Tableau 3 représente les miR qui contrôlent et qui sont contrôlés par des facteurs de transcription hématopoïétiques. Par exemple les miR 221/222 régulent la maturation de l'ARNm de c-kit qui est important pour la survie et l'auto-renouvellement des progéniteurs hématopoïétiques, puisque c-kit est le récepteur du SCF (Felli *et al.* 2005). L'expression du cluster comportant les miR 451/144 est sous le contrôle de GATA-1. A leur tour, ces miR régulent l'ARNm de GATA-2. La régulation de ces miR est cruciale pour l'engagement des cellules progénitrices myéloïdes (CPM) vers la voie de différenciation érythroïde ou mégacaryocytaire (Zhan *et al.* 2007; Dore *et al.* 2008; Pase *et al.* 2009).

Tableau 3 : Liste des miR impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse

Nom	Fonction	Gène cible	Référence
miR-181a	Lymphocyte B	HOXA5	(Chen <i>et al.</i> 2004)
miR-221/222	Erythropoïèse	c-kit	(Felli <i>et al.</i> 2005)
miR-130a	Mégacaryopoïèse	MafB	(Garzon <i>et al.</i> 2006)
miR-10a	Mégacaryopoïèse	HOXA1	(Garzon <i>et al.</i> 2006)
miR-223	Granulopoïèse	NFI-A	(Fazi <i>et al.</i> 2005)
miR-150	Mégacaryo/Erythro	Bcl-2	(Monticelli <i>et al.</i> 2005)
miR-15a**	Erythropoïèse	Myb	(Zhao <i>et al.</i> 2009)
miR-451/144*	Erythropoïèse	GATA-2	(Zhan <i>et al.</i> 2007; Dore <i>et al.</i> 2008; Pase <i>et al.</i> 2009)
miR-210	Erythropoïèse	Pas déterminer	(Kosaka <i>et al.</i> 2008)
miR-24	antagonise l'Erythropoïèse	ALK4	(Wang <i>et al.</i> 2008)
miR-32	Erythropoïèse précoce	Gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation	(Choong <i>et al.</i> 2007)
miR-136			
miR-137			
miR-22**	Maturation érythroïde		
miR-28**			
miR-185**			
miR-16**	Erythropoïèse		

*miR régulé par GATA-1

**miR exprimés en concomitance avec les marqueurs CD71, CD36, CD235a, hémoglobines.

Le miR-28 est inversement corrélé avec la présence de ces marqueurs.

2 OBJECTIFS DU TRAVAIL

2.1 Objectif général

Basé sur les travaux préalablement menés au laboratoire et sur la littérature, nous nous intéresserons aux mécanismes moléculaires et cellulaires qui conduisent à l'inhibition de l'érythropoïèse par la cytokine pro-inflammatoire TNF α . Afin d'étudier l'effet du TNF α sur l'érythropoïèse nous utiliserons des cultures primaires de cellules souches hématopoïétiques. Ce modèle d'étude est obtenu par la mise en culture de cellules CD34 positives (CD34+), isolées à partir de sang de cordon ombilical. Les cellules purifiées sont engagées dans la voie de l'érythropoïèse par stimulation à l'Epo. Certaines expériences sont réalisées sur la lignée cellulaire TF1, dépendante de l'Epo.

2.2 Objectifs spécifiques

L'effet du TNF α sur la survie et la prolifération des cellules CD34+ cultivées en présence d'Epo sera étudié aux plans cellulaire et moléculaire. Notamment, nous analyserons la voie JAK2/STAT5 ainsi que l'expression de gènes essentiels au contrôle du cycle cellulaire, de la survie et de l'apoptose. Les facteurs de survie (Bcl-xL et Mcl1) et de la prolifération (Cycline D1, c-Myc et p27) des progéniteurs hématopoïétiques seront ainsi étudiés.

Au plan cellulaire, l'impact du TNF α sur l'érythropoïèse sera évalué par différents tests indiquant l'érythropoïèse. Plus précisément, le taux de cellules hémoglobinisées (test à la Benzidine) et l'expression de la protéine GPA qui est un marqueur spécifique de l'évolution de l'érythropoïèse ainsi que les modifications morphologiques caractéristiques de l'érythropoïèse (coloration MGG) seront évalués. Par ailleurs, une éventuelle induction de la différenciation des cellules CD34+ vers d'autres voies de l'hématopoïèse ainsi que l'inhibition de celle de l'érythropoïèse par le TNF α seront étudiées par cytométrie de flux.

Au plan moléculaire, l'effet du TNF α sur l'expression de gènes érythroïde-spécifiques (globine α , β , γ , et REpo) aux différents stades de l'érythropoïèse sur les progéniteurs hématopoïétiques stimulés avec de l'Epo et traités ou non avec 20 ng/mL de TNF α sera étudié. L'impact du traitement au TNF α sur l'expression des facteurs de transcription clés comme GATA-1, GATA-2 et PU.1 sera ainsi analysé.

Afin de vérifier l'effet du TNF α sur les voies de signalisation induites par l'Epo *via* son récepteur REpo, nous analyserons l'état de phosphorylation/activation de la p38MAPK en utilisant l'inhibiteur spécifique SB203580.

Compte tenu des résultats déjà obtenus et publiés par le laboratoire, nous focaliserons particulièrement nos études sur le facteur GATA-1. La balance GATA-1/GATA-2, qui évolue de manière déterminante pour le bon déroulement de la différenciation, sera analysée au cours de l'érythropoïèse en présence ou en absence du TNF α . L'interaction de GATA-1 avec PU.1 sera également analysée par immunoprécipitation protéique. L'activité transcriptionnelle de GATA-1 sera étudiée par des expériences de transfections transitoires en utilisant la lignée TF1 qui possède un faible niveau d'expression de GATA-1.

Le raseau des miRNA étant impliqué dans la régulation de la différenciation, nous étudierons l'effet du TNF α sur les miRNA impliqués dans la balance GATA-1/GATA-2 comme les miRNA 451 et 144. Afin d'analyser la modulation par le TNF α de l'expression de microARN spécifiques la lignée TF1 sera utilisée.

3 MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 Isolement et enrichissement des cellules CD34+ et GPA+

Les échantillons de sang de cordon ombilical sont fournis par la maternité de la Clinique Bohler au Luxembourg. Les donneurs sains ont approuvé la procédure protocolaire validée par le comité d'éthique de la clinique ainsi que par le comité national d'éthique de la recherche (CNER). Le sang de cordon est collecté dans des tubes de 50 mL contenant 20 U/mL d'héparine (Ratiopharm, Allemagne) diluée dans 5 mL de PBS. Le sang est dilué au 1:4 dans du PBS contenant 2 mM d'éthylène-diamin-tetra-acétate (EDTA, MP Biomedicals). La solution diluée est délicatement posée sur 15 mL de Ficoll-Paque Premium (GE healthcare, Pays-Bas). Les cellules mononucléées sont récupérées à partir de l'interphase après centrifugation (30 min à 400 g et à 20°C) et lavées avec du PBS/EDTA. Avant de procéder à la purification sur colonne magnétique (kit human Midi MACS CD34 Microbead, Miltenyi Biotec, Pays-Bas), les cellules sont comptées et mises en contact avec des billes magnétiques couplées à l'anticorps anti-CD34 humain. Les cellules sont reprises dans 300 µL de tampon MACS (magnetic cell sorting) composé de PBS complété avec 5% de BSA et 2 mM d'EDTA, 100 µL pour 10⁸ cellules de microbilles CD34 et 100 µL pour 10⁸ cellules d'agents bloquant les fragments FcR (MACS Miltenyi Biotec). Après incubation pendant 30 min à 4°C la totalité est déposée sur une colonne équilibrée auparavant avec 3 mL de tampon MACS (LS, MACS Miltenyi). Trois lavages successifs avec 3 mL de tampon MACS sont effectués. L'élution est réalisée par la suite en utilisant 4 mL de tampon MACS. Les 4 mL de l'élution sont déposés sur une deuxième colonne équilibrée. L'élution finale est réalisée dans 4 mL de tampon MACS. Les cellules récupérées sont comptées et mises en culture à une concentration de 2x10⁵ cellules/mL.

La procédure d'isolement des cellules exprimant la GPA (cellules GPA+) est similaire à celle utilisée pour l'isolement des cellules CD34+. La seule différence consiste à utiliser des microbilles couplées à la protéine GPA (MACS Miltenyi Biotec).

3.2 Culture cellulaire

Cellules souches progénitrices hématopoïétiques (CD34+)

Les cellules CD34+ isolées ont été reprises à une concentration de 2x10⁵ cellules/mL dans du milieu sans sérum spécifiquement adapté à la culture des cellules souches hématopoïétiques, le milieu Stem Line Medium II (Sigma, Belgique) (milieu 1) utilisé comme

milieu principal dans toute l'étude, ou le milieu STEMPRO[®]-34 (Gibco[™], Belgique), (milieu 2, utilisé occasionnellement lorsque c'est mentionné). Le milieu utilisé est complété avec 10 U/mL de pénicilline/streptomycine (Sigma, Belgique) et 4 mM de L-glutamine (Cambrex-Lonza, Allemagne).

Nous ajoutons dans le milieu de l'IL3 (Reliatech, Allemagne) qui permet l'autorenouvellement des cellules et du SCF (Reliatech, Allemagne) qui assure la prolifération et la survie des progéniteurs. Ces deux facteurs ont des effets synergiques sur les progéniteurs CD34+. L'ajout de l'Epo (EPREX, Epoétine α , Janssen Cilag) induit leur engagement vers la différenciation érythroïde. La composition du milieu prolifératif et différenciant est basé sur le protocole établi par Carlile *et al.* (Carlile *et al.* 2004): 10 ng/mL d'IL3 et 10 ng/mL de SCF du jour -3 (J-3) (mise en culture) à J0 (addition de l'Epo); 10 ng/mL d'IL3, 10 ng/mL de SCF et 2 U/mL d'Epo, de J0 à J4; 10 ng/mL de SCF et 2 U/mL d'Epo, de J4 à J6; 2 U/mL d'Epo à partir de J6. Le milieu additionné d'Epo correspond au milieu différenciant (Figure 16A).

L'influence de la chronologie du traitement initial au TNF α (à J-3 ou à J0 ; Reliatech, Allemagne) sur l'érythropoïèse par rapport à l'ajout de l'Epo (à J0) a été évaluée par le pourcentage de cellules hémoglobinisées à différents temps de culture (coloration à la benzidine). Deux séquences de traitement de 20 ng/mL de TNF α ont été testées. La première consiste à ajouter le TNF α au début de la mise en culture des cellules (J-3) et à répéter le traitement aux jours 0, 4 et 6. Dans la seconde, le TNF α n'est ajouté qu'à partir du jour 0. Quelque soit le moment du traitement initial au TNF α le taux de cellules produisant de l'hémoglobine est similaire à celui des cellules traitées à l'Epo seule (Figure 16B). Nous avons décidé de réaliser les traitements des CD34+ avec 20 ng/mL de TNF α en même temps que l'ajout de l'Epo (J0) (Figure 16A). Le TNF α est donc ajouté à J0, J4 et J6 à une concentration de 20 ng/mL une heure avant l'Epo.

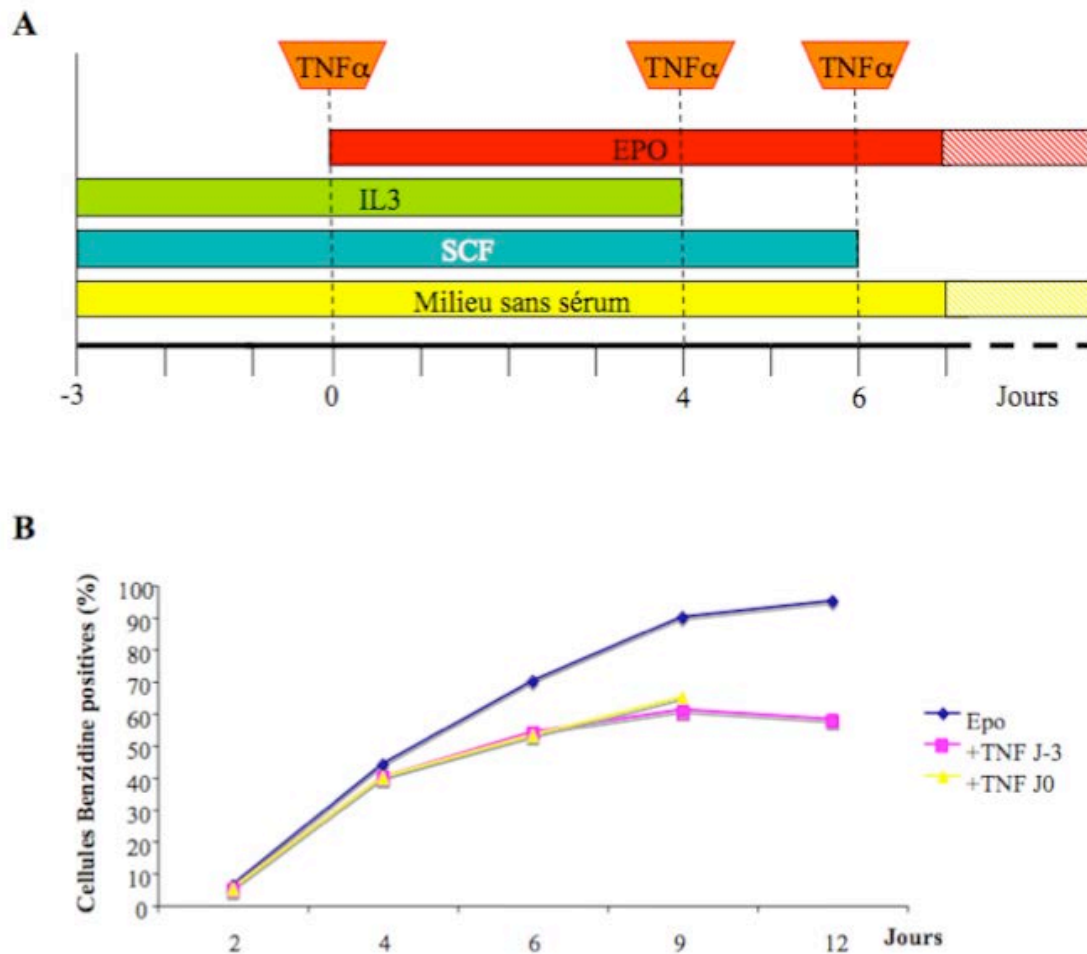


Figure 16 : Conditions de culture et de différenciation de CD34+

A. Les cellules CD34⁺ sont cultivées dans du milieu sans sérum. Les cytokines (10 ng/mL de SCF, 10 ng/mL d'IL3, 2 U/mL d'Epo, 20 ng/mL de TNF α) sont ajoutées aux jours indiqués (Carlile *et al.* 2004). J0 correspond à l'ajout de l'Epo dans le milieu (milieu différenciant) afin de déclencher l'érythropoïèse 3 jours après la mise en culture des cellules CD34⁺ (J-3).

B. Deux séquences de traitement au TNF α (20 ng/mL) ont été testées. La première consiste à ajouter le TNF α au début de la mise en culture des cellules (J-3) (trait rose) et à répéter le traitement aux jours 0, 4 et 6. Dans la seconde (trait jaune), le TNF α n'est ajouté qu'à partir du jour 0.

Lignées cellulaires établies

Toutes les lignées proviennent de la compagnie DSMZ (Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen).

TF1: Cette lignée a été établie en 1987 à partir du prélèvement de cellules dans la moelle osseuse d'un patient de 35 ans atteint d'une érythroleucémie (AML M6) (Kitamura *et al.* 1989). Ces cellules prolifèrent sous l'effet de différents facteurs comme l'Epo, le GM-CSF, l'IFN γ , l'IL3, IL4, IL5, IL6, TNF α . Les cellules sont maintenues en culture en présence de GM-CSF (5 ng/mL, Reliatech, Allemagne). Avant d'être traitées avec l'Epo, les cellules TF1 sont privées de GM-CSF pendant 12 heures.

K562: Cette lignée a été établie à partir de cellules issues d'une leucémie myéloïde chronique en phase blastique, prélevées dans le liquide pleural d'une patiente de 53 ans (Lozzio *et al.* 1975). Les cellules K562 sont porteuses du chromosome de Philadelphie et expriment l'oncoprotéine de fusion BCR-ABL (breakpoint cluster region-Abelson) (McGahon *et al.* 1994).

HEL (Human erythroleukemia cell line): Cette lignée a été établie à partir de sang périphérique d'un homme âgé de 30 ans atteint d'une LAM (Leucémie aiguë lymphoblastique) (Martin *et al.* 1982). Elle présente une mutation au niveau de la kinase JAK2 (V617F).

Les cellules sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Cambrex-Lonza, Belgique) complété de 10 % de SVF (sérum de veau fœtal) (Hyclone, Perbio, Belgique), d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 μ g/mL de Cambrex-Lonza) et d'agents antifongiques (amphotéricin B à 25 μ g/mL de Cambrex-Lonza). Le traitement des cellules TF1 avec 20 ng/mL de TNF α est réalisé une heure avant d'ajouter l'Epo (10 U/mL). Tous les trois jours, le milieu est renouvelé et les cellules sont reprises à une concentration de 2×10^5 cell/mL.

Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C, à 95% d'humidité et 5% de CO $_2$. Le comptage des cellules viables au microscope optique à contraste de phase se fait par le test d'exclusion au bleu Trypan (Cambrex-Lonza) en utilisant une cellule de Malassez (Marienfeld).

3.3 Coloration de May-Grünwald Giemsa

La coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG) est l'une des techniques utilisées couramment pour le diagnostic de nombreuses maladies du sang. Le principe repose sur l'action complémentaire de deux colorants neutres et sur l'affinité des éléments cellulaires pour les colorants acides ou basiques. Le premier colorant est le May-Grünwald (Merck, Belgique), neutre, contenant un colorant acide, l'éosine, et un colorant basique, le bleu de méthylène. Le deuxième colorant est le Giemsa (Merck), neutre, contenant lui aussi de l'éosine, et un colorant basique, l'azur de méthylène. Ces deux colorants sont solubilisés dans l'alcool méthylique et sont de ce fait inactifs, c'est le contact avec l'eau qui leur donne un pouvoir colorant. Les éléments cellulaires acides sont sélectivement colorés en bleu par les colorants basiques et sont qualifiés de basophiles (ADN, cytoplasme des lymphocytes). Les éléments cellulaires basiques sont colorés en orange sélectivement par les colorants acides et sont qualifiés d'acidophiles ou éosinophiles (cytoplasme des hématies). Les éléments neutrophiles sont colorés en beige-rose à la fois par les colorants acides et basiques. Enfin les éléments azurophiles sont colorés en pourpre.

2×10^5 cellules sont centrifugées à 340 g pendant 7 min. Le culot est ensuite lavé avec 1 mL de PBS (Phosphate buffered saline) 1X. Une nouvelle centrifugation est réalisée à 340 g pendant 7 min et le culot cellulaire est resuspendu dans 100 μ L de PBS 1X. La suspension cellulaire est projetée sur une lame par cyto centrifugation (Cytofuge[®] 2 de STAT Spin). Les cellules sont fixées en plongeant la lame dans un bain (boîte de Laveran) de May-Grünwald pur pendant 5 min. La lame est ensuite plongée dans un bain de May-Grünwald dilué au 1:4 dans de l'eau neutre (1 tablette de tampon pH=6,8 de Merck dans 1 L d'eau distillée) pendant 2 min. La coloration se poursuit par un bain contenant une solution de Giemsa diluée au 1:20^e avec de l'eau neutre pendant 20 min. Finalement la lame est rincée à l'eau neutre et séchée à température ambiante. La préparation est ensuite observée au microscope à contraste de phase et des photos sont acquises à l'aide d'une caméra Leica (Leica DM 2000, Luxembourg).

3.4 Test à la Benzidine

La méthode repose sur le fait que l'hémoglobine peut réduire le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en oxygène capable d'oxyder la benzidine qui se colore en bleu. Les cellules synthétisant de l'hémoglobine sont donc colorées en bleu (la coloration en bleu dépend du pH acide). Le chlorure de benzidine (Fluka Chemika) est dissout dans une solution d'acide acétique 0,5 M pour obtenir une solution à 0,2%. Cette solution de Benzidine est conservée à l'abri de la lumière, à 4°C pendant plusieurs mois.

2×10^5 cellules sont centrifugées à 340 g pendant 7 min. Le culot est ensuite lavé avec 1 mL de PBS 1X. Une nouvelle centrifugation est réalisée à 340 g pendant 7 min et le culot cellulaire est resuspendu dans 100 μ L de sérum physiologique (NaCl 0,9%). A cette suspension cellulaire sont ajoutés 50 μ L d'un mélange de benzidine/ H_2O_2 (500 μ L de Benzidine 0,2% et 10 μ L de H_2O_2 à 30% (Sigma)). La réaction se réalise à l'obscurité, à température ambiante pendant 20 min. La suspension cellulaire est ensuite diluée dans 300 μ L de NaCl 0,9%. Les cellules sont comptées, utilisant la cellule de Malassez, au microscope à contraste de phase. Le taux des cellules différenciées est exprimé en pourcent de cellules synthétisant de l'hémoglobine (cellules bleues ou cellules B+) par rapport à la population totale.

3.5 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une méthode qui permet de révéler des antigènes cellulaires de surface ou intra-cytoplasmiques par immunophénotypage. Elle est basée sur une réaction d'immunofluorescence et associe donc l'interaction antigène/anticorps avec les propriétés des fluorochromes. Un anticorps fluorescent, c'est à dire couplé à un fluorochrome, se fixe spécifiquement à un antigène de surface. L'immunofluorescence est dite directe si l'anticorps monoclonal employé est conjugué directement à un fluorochrome.

2×10^5 cellules sont centrifugées à 340 g pendant 7 min. Le culot est ensuite lavé avec 1 mL de PBS 1X et de nouveau centrifugé. Le culot est repris par 100 mL de PBS 1X et 5 mL d'anticorps couplés à un fluorochrome (Tableau 4). La suspension est incubée pendant 2 heures à 4°C sous agitation douce dans l'obscurité. Ensuite un lavage avec 1 mL de PBS 1X est effectué suivi par la fixation des cellules avec 2% de formaldéhyde pendant 20 min à 4°C dans l'obscurité. La suspension est lavée et centrifugée pendant 7 min à 340 g. Finalement les cellules immunomarquées sont reprises avec 500 μ L de PBS 1X. L'immunofluorescence est mesurée par un cytomètre FACSCalibur (Becton-Dickinson, Belgique). L'étude statistique est basée sur 10.000 événements par échantillon et a été réalisée à l'aide du programme FlowJo (version 8.8.7, Tree Star, Etats Unis).

Tableau 4: Anticorps utilisés pour la cytométrie en flux

Anticorps	Fluorochrome	Référence	Contrôle isotypique	Référence	Spécificité Cellulaire *
CD34	FITC	BD345801	IgG1,κ	BD555748	CSH
CD10	PE-Cy TM 5	BD555376	IgG1,κ	BD555750	Pré-T, Pré-B, granulocytes
CD11b	PE	BD333142	IgG2a,κ	BD555574	Monocytes, macrophages
CD117	APC	BD561118	IgG1,κ	BD555751	CSH
CD24	PE	BD555428	IgG2a,κ	BD555574	Lymphocytes B, granulocytes
CD14	PE	BD555398	IgG2a,κ	BD555574	Monocytes, macrophages
CD15	APC	BD551376	IgM,κ	BD555585	Granulocytes
CD16	FITC	BD335035	IgG1,κ	BD555748	Macrophages, Mastocytes, NK
CD38	PE	BD345806	IgG2a,κ	BD555574	CSH, LT activés, LB, Basophiles, Monocytes
CD41a	FITC	BD555466	IgG1,κ	BD555748	Mégacaryocytes
CD36	PE	BD555455	IgM,κ	BD555584	Progéniteurs érythroïdes, plaquettes
CD235a/GPA	PE-Cy TM 5	BD559944	IgG2b,κ	BD555744	Cellules érythroïdes

* <http://pathologyoutlines.com/cdmarkers.html>

3.6 Microscopie à fluorescence

5×10^5 cellules sont immunomarquées comme nous l'avons préalablement décrit au paragraphe portant sur la cytométrie en flux avec l'anticorps PE-CYTM5 CD235a (GPA). Trois lavages avec 1 mL de PBS 1X sont effectués suivis par la fixation des cellules avec 2% de formaldéhyde pendant 20 min à 4°C et dans l'obscurité. La suspension est lavée et centrifugée pendant 7 min à 340 g. Les cellules sont reprises finalement dans 10 µL de milieu stem line medium II, dépourvu de sérum et complété avec 10 U/mL de pénicilline/streptomycine et avec 10 ng/mL de cytokines IL3 et SCF. On ajoute également dans le milieu 1 µg/mL de Hoechst 33342 (Merck, Belgique) pour le marquage de la chromatine. Cinq µL de cellules immunomarquées sont montées entre lame et lamelle et observées sous un microscope à fluorescence (CellM, Olympus, Belgique).

3.7 Extraction des protéines totales

5×10^5 à 2×10^6 cellules sont lysées dans 50 à 100 µL de tampon de lyse MPER (Mammalian Protein Extraction Reagent, Pierce, Belgique) en présence d'inhibiteurs de protéases (Complete, ROCHE) et de phosphatases 1X (PhosphoSTOP, ROCHE). Après 15 min à forte agitation à 4°C, l'homogénat est centrifugé 15 min à 17.000 g à 4°C et le lysat protéique est dosé par la méthode de Bradford en utilisant le réactif BioRad (BioRad Laboratories, France).

3.8 Extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques

Les protéines nucléaires et cytoplasmiques sont extraites à partir de 7×10^6 cellules selon la méthode de Schreiber *et al.* (Schreiber *et al.* 1989). Les cellules sont placées dans un tampon hypertonique contenant des inhibiteurs de protéases et la membrane cytoplasmique est lysée par un agent tensio-actif. L'extraction se réalise dans la glace pour éviter la dénaturation des protéines.

Les cellules sont lavées une fois dans du PBS 1X puis centrifugées 5 min à 340 g. Le culot est repris dans 400 µL de tampon A (HEPES 10 mM à pH=7,9, KCl 10 mM ; EDTA 0,1 mM ; EGTA 0,1 mM ; DTT 1 mM ; PMSF 0,5 mM ; Complete ; PhosphoStop 1X) et incubé pendant 15 min sur la glace. Ensuite 25 µL d'Igepal 10% sont ajoutés. Le mélange est vigoureusement agité pendant 10 sec. Après une centrifugation de 30 sec à 15.700 g à 4°C, le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques est transféré dans un autre tube. Le culot contenant les noyaux est repris par 50 µL de tampon B (HEPES 20 mM à pH=7,9 ; NaCl 0,4 mM ; EDTA 1 mM ; EGTA 1 mM ; DTT 1 mM ; PMSF 1 mM ; Complete ; PhosphoStop 1X; Glycérol 20%).

La suspension est vigoureusement agitée (agitation horizontale) pendant 15 min à 4°C. L'agitation est suivie d'une centrifugation de 5 min à 12.000 g à 4°C. Le surnageant contenant les protéines nucléaires est réparti en aliquots d'environ 10 µL qui sont conservés à -80°C. La quantification des protéines se fait par la méthode de Bradford (réactif BioRad, France).

3.9 Western blot

10 à 20 µg de protéines sont déposés sur gel SDS-PAGE (10%), puis transférés sur une membrane de polyvinylidene fluoride (PVDF) (GE Healthcare, Pays-Bas). Les membranes sont saturées pendant 1 heure à température ambiante (T. amb.) ou pendant la nuit à 4°C, dans du phosphate buffered saline (PBS) dans lequel est ajouté 0,1% Tween 20 (PBS-T) additionné de 5% de lait ou 5% de BSA selon l'anticorps qui sera utilisé. Les membranes sont incubées avec les anticorps primaires dilués dans du PBS-T additionné de 5% de lait pendant la nuit à 4°C ou 1 heure selon les conditions établies pour chacun des anticorps primaires utilisés. Après plusieurs lavages dans du PBS-T, les membranes sont incubées 1 heure à T. amb. avec l'anticorps secondaire adéquat (Tableau 5). Après incubation avec les anticorps, les membranes subissent un cycle de lavages dans du PBS-T 1X. La détection des protéines se fait par chimioluminescence avec le système ECL (Pierce, Belgique).

Tableau 5: Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les western blots

Protéine Cible	Poids Moléculaire (KDa)	Saturation	AC primaire	AC secondaire
GATA-1	47	PBS-T - 5% BSA Incubation:1 h, T. amb.	C-20 sc-1233X Dilution : 1/5000e Incubation : 12 h, 4°C	sc-2020 chèvre Dilution : 1/3000e
GATA-1	47	PBS-T - 5% lait Incubation:1 h, T. amb.	N1 sc-266X Dilution : 1/2500e Incubation : 12 h, 4°C	sc-2006 rat Dilution : 1/7000e
GATA-2	50	PBS-T - 5% lait Incubation : 12 h, 4°C	H-116 sc-9008 Dilution:1/8000e Incubation : 1 h, T. amb.	sc-2313 lapin Dilution : 1/4000e
PU.1	40	PBS-T - 5% lait Incubation : 12 h, 4°C	Spi-1 T-21 sc-352 Dilution : 1/500e Incubation : 1 h, T. amb.	sc-2313 lapin Dilution : 1/5000e
c-Myc	65	PBS-T - 5% lait Incubation : 12h, 4°C	BD Pharmigen 551101 Dilution : 1/250° Incubation : 1 h, T. amb.	sc-2005 souris Dilution : 1/1000e
REpo	66/78	PBS-T - 5% lait Incubation : 12h, 4°C	M-20 sc-697 Dilution : 1/1000e Incubation : 1 h, T. amb.	sc-2313 lapin Dilution : 1/5000e
globine α	10	PBS-T - 5% lait Incubation : 12h, 4°C	D-16 sc-31110 Dilution : 1/2000e Incubation : 1 h, T. amb.	sc-2020 chèvre Dilution : 1/5000e
globine β	16	PBS-T - 5% lait Incubation : 12h, 4°C	37-8 sc-21757 Dilution : 1/2000e Incubation : 1 h, T. amb.	sc-2005 souris Dilution : 1/5000e
globine γ	18	PBS-T - 5% lait Incubation : 12h, 4°C	51-7 sc-21756 Dilution : 1/8000e Incubation : 1 h, T. amb.	sc-2005 souris Dilution : 1/10000e
p38MAPK	43	PBS-T - 5% BSA Incubation : 1 h, T. amb.	#9212 Cell Signaling Dilution : 1/1000e Incubation : 12 h, 4°C	sc-2313 lapin Dilution : 1/2000e
p38MAPK phosphorylée	43	PBS-T - 5% BSA Incubation : 1 h, T. amb.	#9211 Cell Signaling Dilution : 1/1000e Incubation : 12 h, 4°C	sc-2313 lapin Dilution : 1/2000e
JAK2	125	PBS-T - 5% BSA Incubation : 1 h, T. amb.	#3230 Cell Signaling Dilution : 1/20000e Incubation : 12 h, 4°C	sc-2313 lapin Dilution : 1/1000e

JAK2 phosphorylé Y1007-1008	125	PBS-T - 5% BSA Incubation : 1 h, T. amb.	#3776 Cell Signaling Dilution : 1/1000e Incubation : 12h, 4°C	sc-2313 lapin Dilution : 1/1000e
STAT5	92	PBS-T - 5% BSA Incubation : 1 h, T. amb.	#9363 Cell Signaling Dilution : 1/5000e Incubation : 12 h, 4°C	sc-2313 lapin Dilution : 1/1000e
STAT5 Phosphorylé Y694	92	PBS-T - 5% BSA Incubation : 1 h, T. amb.	#9351S Cell Signaling Dilution : 1/1000e Incubation : 12 h, 4°C	sc-2313 lapin Dilution : 1/2000e
Bcl-xL	30	PBS-T - 5% lait Incubation : 12 h, 4°C	BD Pharmigen 610212 Dilution : 1/1000° Incubation : 12 h, 4°C	sc-2313 lapin Dilution : 1/4000e
Mcl-1	40	PBS-T - 5% BSA Incubation : 1 h, T. amb.	#4572 Cell signaling Dilution : 1/1000° Incubation : 12 h, 4°C	sc-2313 lapin Dilution : 1/4000e
Cycline D1	37	PBS-T - 5% lait Incubation : 1h, T. amb.	sc718 Dilution : 1/2000° Incubation : 12 h, 4°C	sc-2313 lapin Dilution : 1/4000e
P27	27	PBS-T - 5% lait Incubation : 1h, T. amb.	Sc527 Dilution : 1/1000° Incubation : 12 h, 4°C	sc-2313 lapin Dilution : 1/4000e
Lamine B	65	PBS-T - 5% lait Incubation : 1h, T. amb.	Sc6216 Dilution : 1/1000° Incubation : 12 h, 4°C	sc-2020 chèvre Dilution : 1/2000e
Actine β	42	PBS-T - 5% lait Incubation : 12 h, 4°C	A5441 Sigma Aldrich Dilution : 1/5000e Incubation : 1 h, T. amb.	sc-2005 souris Dilution : 1/10000e

3.10 Immunoprécipitation protéique

Le protocole d'immunoprécipitation protéique se base sur le protocole proposé par Ribeil *et al.* (Ribeil *et al.* 2007). Les protéines totales ou nucléaires (200 µg) sont diluées au 1:3 dans de l'eau. 2 µg d'anticorps anti-GATA-1 (C20X, sc-1233X) et 100 µL de protein G Microbeads (Miltenyi) sont ajoutés au mélange. Après incubation pendant 1 heure et 30 min sous agitation légère à 4°C, le mélange est déposé sur une colonne (µColumn, MACS) préalablement équilibrée avec 200 µL de tampon de lyse (voir paragraphe extraction de protéines nucléaires et cytoplasmiques). L'immunocomplexe est immobilisé dans la colonne et lavé trois fois avec 200 µL de tampon de lyse. La colonne est équilibrée avec 20 µL de tampon d'élution (50 mM TrisHCl pH=6,8, 50 mM DTT, 1% SDS, 0,005% bleu de bromophénol, 10% glycérol) préchauffé à 95°C. Finalement un nouveau tube est placé sous la colonne, et l'immunocomplexe est élué par l'ajout de 50 µL de tampon d'élution préchauffé à 95°C. En parallèle, 20 µg de protéines sont immunoprécipitées par l'IgG anti-chèvre en tant que contrôle.

3.11 Retard de migration sur gel ou gel retard

Le gel retard est une technique moléculaire qui permet la détermination des interactions protéines/ADN *in vitro*. Cette technique repose sur le fait que les complexes protéine/ADN migrent plus lentement que les fragments d'ADN purifiés dans un gel d'électrophorèse non-dénaturant de polyacrylamide. La vitesse de migration du complexe est fonction du poids moléculaire de la protéine.

Les sondes oligonucléotidiques utilisées contiennent les séquences consensus reconnues par NF-κB (sens 5'-AGTTGAGGGACTTTCCCAGGC-3' double brin), STAT5 (sens 5'-AGATTTCTAGGAATTCAATCC-3' double brin), ainsi que la sonde STAT5 mutée (sens 5'-AGATTTAGTTTAATTCAATCC-3' double brin). Les sondes double brin sont formées par hybridation de quantités équivalentes de brin sens et antisens.

L'hybridation des deux brins est réalisée dans un tampon (Tris pH=7,5 ; MgCl₂ 65 mM ; DTT 33 mM ; EDTA 6,5 mM) soumis à une série de températures décroissantes. Les sondes double brin sont ensuite précipitées par 0,1 volume d'acétate de Na (3 M) et 3 volumes d'éthanol à 100 % à 20°C. Après 2 à 3h, ce mélange est centrifugé à 14.000 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est éliminé puis le culot est lavé avec 200 µL d'éthanol à 75 %. Après une centrifugation à 4°C et à 14.000 g pendant 10 min, le culot est séché et repris dans 15 µL H₂O (200 ng/µL).

Le marquage enzymatique des sondes est réalisé par la polynucléotide kinase T4 (Roche) qui catalyse le transfert d'un groupement phosphate en position γ de l'ATP ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, MP Biomedicals, France) sur la terminaison 5' hydroxylée de l'ADN. Environ 0,2 ng de sonde radiomarquée sont incubés à 4°C dans un mélange contenant 5 à 10 μg d'extraits nucléaires, 2,5 μL de tampon de liaison (Tris pH=8 10 mM ; NaCl 50 mM ; EDTA 1 mM ; Glycérol 5% (v/v) ; DTT 1 mM ; PMSF 2,5 mM), 2,5 μL de poly-dIdC à 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (compétiteurs de la sonde d'ADN pour éliminer la fixation non-spécifique de protéines), 1 μL de spermidine, 2 μL d'albumine de sérum de veau à 2 mg/mL et 1 μL d'inhibiteurs de protéases.

Après un temps d'incubation défini sur la glace, le mélange est alourdi par addition de 5 μL de tampon échantillon (Glycérol 30% (v/v) ; TBE 1X ; Bleu de bromophénol 0,0005% (p/v) ; et Xylène cyanole 0,0005% (p/v)) avant d'être déposé sur un gel non-dénaturant de polyacrylamide à 5%. Les complexes protéines/ADN formés sont alors séparés par électrophorèse pendant 3 heures à environ 30 mA dans du TBE 0,5X. Le gel est ensuite séché à chaud par aspiration sous vide puis la révélation se fait par autoradiographie par mise en contact direct avec un film Kodak X-Omat (Amersham). Le signal radioactif est également visualisé et analysé grâce à un Phosphorimager (Cyclone).

Afin de déterminer la protéine qui correspond aux bandes observées, nous avons ajouté des anticorps spécifiques de la protéine en question (anti-p50 et anti-p65, Santa Cruz Biotechnologies). Les anticorps vont se fixer sur la protéine contre laquelle ils sont dirigés afin de former un complexe ternaire, anticorps/protéine/sonde. Le poids de ce complexe étant plus élevé, sa mobilité à travers le gel va être diminuée. Par conséquent nous pouvons observer un décalage (super shift) de la bande. Si l'anticorps reconnaît la partie de la protéine qui se fixe sur l'ADN le complexe protéine/sonde est incapable de se former. Dans ce cas nous parlons d'immunodéplétion.

3.12 Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits à partir de 3×10^6 cellules traitées ou non. Les cellules ont été lavées au PBS 1X, centrifugées à 350 g pendant 7 min, puis lysées avec le réactif TRIzol[®] (Invitrogen, Merelbeke, Belgique). Les ARN totaux ont été séparés de l'ADN par addition de chloroforme et centrifugation. Les ARN présents dans la phase aqueuse ont été mis en présence d'isopropanol. Les culots des ARN totaux ont été élués avec de l'eau ARNase free et quantifiés au spectrophotomètre (Nanodrop[®] ND-1000).

3.13 Transcription inverse et PCR en temps réel

La transcription inverse est réalisée sur 1,5 µg d'ARN totaux, utilisant le kit « ReactionReady[™] First Strand cDNA Synthesis Kit (C-01) » (Superarray, Tebu-bio, Boechout, Belgique). Les ADNc générés ont été mélangés au mix « RT² Real-Time[™] SYBR Green/ROX PCR Master Mix » (Superarray, Tebu-bio), contenant le tampon real-time PCR, l'ADN Taq polymérase HotStart, des nucléotides, le fluorochrome SYBR[®]Green. Le mélange est déposé dans les puits d'une microplaque de 96 puits tapissée d'amorces nucléotidiques spécifiques (20 µL/puits). Les numéros de référence des gènes cibles des amorces sont détaillés dans le Tableau 6. La PCR en temps réel a été réalisée à l'aide de l'appareil 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Belgique). La modification du niveau d'expression des gènes est calculée selon la méthode des $\Delta\Delta C_T$. Les valeurs brutes ont été normalisées par rapport aux gènes de ménage, GAPDH et S14 dont l'expression reste stable au cours du traitement.

Tableau 6: Séquences utilisées pour la fabrication du kit RT² Profiler PCR Array System

Symbole	Code Unigene	No de séquence référence	Nom du gène
GATA1	Hs.765	NM_002049	GATA-1
GATA2	Hs.367725	NM_032638	GATA-2
SPI1 (PU.1)	Hs.502511	NM_003120	SFFV proviral integration 1
HBA1	Hs.449630	NM_000558	globine α
HBB1	Hs.523443	NM_000518	globine β
HBG1	Hs.712539	NM_000559	globine γ
REpo	Hs.702356	NM_000121	Récepteur de l'érythropoïétine
GYPA (GPA)	Hs.434973	NM_002099	Glycophorine A
ITGAM (CD11b)	Hs.172631	NM_000632	Intégrine AM
ITGA2B (CD41)	Hs.411312	NM_000419	Intégrine A2B
MRPS14	Hs.247324	NM_022100	Protéine mitochondriale ribosomale S14
GAPDH	Hs.544577	NM_002046	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

3.14 Transfections de plasmides à expression transitoire

Les cellules TF1 ont été transfectées par électroporation en utilisant le BioRad gene Pulser. Le principe de cette technique est basé sur la capacité de perméabiliser momentanément la membrane plasmique par une décharge électrique (TF1 : 250 V et 975 μ F). Ceci permet d'introduire des plasmides dans la cellule.

Les plasmides utilisés sont :

pXM-GATA-1 : plasmide qui contient le gène codant la protéine GATA-1 (don de (Collavin *et al.* 2004).

pGL3-GATA-Luc : plasmide contenant le gène rapporteur Luciférase (Firefly) placé sous le contrôle d'un promoteur avec trois séquences consensus GATA (Blobel *et al.* 1998).

Le nombre de cellules par transfection est de $3,75 \times 10^6$ cellules à une concentration de $1,5 \times 10^7$ cell/mL soit 250 μ L mélangés avec 5 μ g de plasmide adéquat. Le plasmide pRL-SV40 (Promega) exprimant la Luciférase (Renilla) est utilisé à chaque transfection comme contrôle interne de transfection. Afin de surexprimer GATA-1 dans les TF1 nous avons utilisé le plasmide pXM-GATA-1. 24 h après transfection les cellules sont remises à 1×10^6 cell/mL et sont traitées au TNF α (20 ng/mL) pendant 2 h.

L'activité de la luciférase est évaluée en utilisant le réactif Dual-GloTM Luciférase (Promega). 75 μ L de ce réactif sont ajoutés aux cellules et le mélange est incubé pendant 10 min à 22°C. L'activité de la Renilla est ensuite mesurée après ajout de 75 μ L du réactif Dual-GloTM Stop & Glo[®] Reagent (Promega). Le mélange est incubé pendant 10 min à 22°C. Les activités de Firefly et de Renilla sont mesurées avec un luminomètre (Berthold) et les résultats sont exprimés en unités arbitraires de lumière et correspondent à l'activité Luciférase Firefly rapportée à l'activité Renilla.

3.15 Analyse des miR

Deux à 4×10^6 cellules TF1 ont été utilisées afin d'extraire les ARN totaux à l'aide du TRIzol[®] (voir § 3.12). La transcription inverse des miR a été réalisée à l'aide du kit « miScript PCR System » (Qiagen, Venlo, Pays Bas). Le kit contient une PolyA-polymérase et une transcriptase inverse, afin dans un premier temps de polyadényler les miR, et dans un second temps, de réaliser la transcription inverse qui converti tous les ARN codant ou non codant en ADNc, en utilisant des amorces oligo-dT et des amorces aléatoires. L'amorce oligo-dT comporte une séquence additionnelle « Tag », qui est utilisée lors de la PCR en temps réel. Le protocole de transcription inverse est réalisé sur un maximum de 1 μ g d'ARN totaux.

La PCR en temps réel est réalisée avec le kit « miScript SYBR Green PCR » (Qiagen), sur une quantité d'ADNc comprise entre 2 et 40 ng. Les amorces utilisées sont spécifiques des miR-144 (MIMAT0004600) et 451 (MIMAT0001631). Le kit est fourni avec une amorce universelle, s'hybridant avec la séquence Tag incorporée par l'oligo-dT. Le mélange réactionnel contient une HotStarTaq ADN Polymerase, le tampon de réaction, le SYBR Green, les dNTP, un fluorophore passif de référence ROX et 2,5 mM de MgCl₂. La PCR en temps réel a été réalisée à l'aide de l'appareil 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems). La modification du niveau d'expression des gènes est calculée selon la méthode des $\Delta\Delta C_T$ et les valeurs brutes ont été normalisées par rapport aux gènes de ménage, RNU1A (numéro de référence NCBI GENE : 6060) et RNU6B (numéro de référence NCBI GENE : 26826) dont l'expression reste stable au cours du traitement.

3.16 Analyses statistiques

Les analyses statistiques des résultats sont effectuées pour des expériences réalisées au moins trois fois et de manière indépendante. Les résultats présentés correspondent à la moyenne \pm écart type. Leur significativité a été évaluée par le test t de Student. Les résultats ont été jugés statistiquement différents et symbolisés par des astérisques lorsque la valeur P est *P<0,05, **P<0,01 et ***P<0,001.

4 RESULTATS

De nombreux travaux ont démontré le rôle des cytokines pro-inflammatoires dans le développement d'anémies liées aux cancers et aux maladies inflammatoires chroniques. Le TNF α est particulièrement reconnu pour son implication dans ce phénomène, notamment en affectant le processus de différenciation érythroïde. Cependant, les mécanismes mis en jeu dans l'effet inhibiteur du TNF α sur l'érythropoïèse restent peu connus. Dans des travaux préalables réalisées au laboratoire LBMCC, le rôle du facteur de transcription GATA-1 a été mis en évidence dans l'effet inhibiteur du TNF α sur la différenciation érythroïde de lignées cellulaires induites par des agents chimiques.

Dans ce travail, nous avons voulu vérifier que le TNF α pouvait agir directement sur des cellules souches hématopoïétiques (CSH) induites à se différencier en présence d'Epo.

Nous avons réalisé la mise au point de l'isolement des CSH CD34 $^{+}$ et de leur culture. L'érythropoïèse a été reproduite *in vitro* et l'effet du TNF α sur cette voie de différenciation a pu être étudié aux niveaux cellulaire et moléculaire. L'effet sur la prolifération et la survie cellulaire ainsi que sur la différenciation des cellules CD34 $^{+}$ a été étudié. Sur le plan moléculaire, nos investigations ont porté sur les voies de signalisation et de régulation transcriptionnelle. Notamment, l'expression des gènes spécifiques de la voie érythroïde et le rôle de facteurs de transcription hématopoïétiques ainsi que de microARN ont été étudiés dans les cellules traitées au TNF α . Nous nous sommes également intéressés au rôle de la protéine kinase MAPKp38 dans l'effet inhibiteur du TNF α sur l'érythropoïèse.

4.1 Isolement des cellules CD34 $^{+}$ et caractérisation du modèle

4.1.1 Enrichissement en cellules CD34 $^{+}$ et phénotypage des populations cellulaires en culture

Les cellules souches/progéniteurs hématopoïétiques (CSH) caractérisées par l'expression des glycoprotéines membranaires CD34, CD117 (récepteur ckit) et CD38 ont été isolées à partir de sang de cordon ombilical. Les cellules mononucléées ont été enrichies en cellules CD34 positives (CD34 $^{+}$) à l'aide de billes magnétiques couplées à un anticorps anti-CD34. La pureté de la fraction en CSH a été vérifiée par la présence des marqueurs CD34, CD38 et CD117 en cytométrie en flux après purification des cellules (J-3). Les cellules qui composent la population après enrichissement expriment très fortement les marqueurs CD34, CD38 et CD117 (99,3% ;

97% et 99,6% respectivement). Des doubles marquages (CD34/CD38 et CD117/CD38) ont été effectués afin de démontrer que les cellules purifiées sont exclusivement des cellules progénitrices hématopoïétiques. Les doubles marquages (CD34/CD38 et CD117/CD38) ont révélé une proportion de progéniteurs CD34+/CD38+ et de progéniteurs CD117+/CD38+ de 96% et 95% en moyenne respectivement, montrant ainsi l'efficacité de la technique d'isolement des CSH (Figure 17). Ainsi, plus que 95% des cellules mises en culture dans les travaux suivants seront considérées comme des CSH, présentant la capacité d'auto-renouvellement et de prolifération.

Nous avons répété les doubles marquages (CD34/CD38 et CD117/CD38) des cellules mises en culture depuis trois jours (J0) dans du milieu spécifique sans sérum contenant de l'IL3, qui permet l'auto-renouvellement des cellules et du SCF qui assure la prolifération et la survie des progéniteurs (cf. Matériels et Méthodes), afin de vérifier l'évolution des CSH isolées. Les analyses par cytométrie en flux après trois jours de culture montrent l'apparition de 50% et 40% de cellules ayant perdu l'expression du CD38 (CD34+/CD38-, CD117+/CD38- respectivement) alors que 26% et 40% des CSH se sont maintenues au stade de CD34+/CD38+ et CD117+/CD38+. La diminution du marqueur CD38 est prévisible dans nos conditions de culture (von Laer *et al.* 2000). Environ 80% des cellules demeurent CD34+/CD117+, avec des capacités d'auto-renouvellement et de prolifération caractéristiques des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques. Cependant, des cellules à un stade plus avancé dans une voie de différenciation hématopoïétique sont vraisemblablement représentées par 13% de cellules CD34-/CD38-, 6% de CD117-/CD38-, ainsi que 11% de CD34-/CD38+ et 17% de CD117-/CD38+ (Figure 18).

Compte tenu de la présence supposée de cellules en cours de différenciation à J0, nous avons voulu caractériser les différents types cellulaires présents dans la culture de CSH. Des marqueurs spécifiques (précoces et tardifs) des différentes lignées hématopoïétiques ont été utilisés en cytométrie en flux (Tableau 4). L'analyse des marqueurs spécifiques de précurseurs hématopoïétiques (CD10), des phénotypes érythrocytaires (CD36 et CD235a/GPA), mégacaryocytaires (CD41a) et myélo-monocytaires (CD11b, CD14, CD15, CD16 et CD24) au sein de la population cellulaire a été réalisée par simples marquages. Les marqueurs CD10, CD14, CD16, CD24 et CD41a ne sont pas présents alors que les CD36, CD235a/GPA, CD11b et CD15 sont très faiblement exprimés (Figure 19). L'identification des marqueurs dans la culture cellulaire donne une indication qualitative et montre que les cellules en culture à J0 sont majoritairement des CSH.

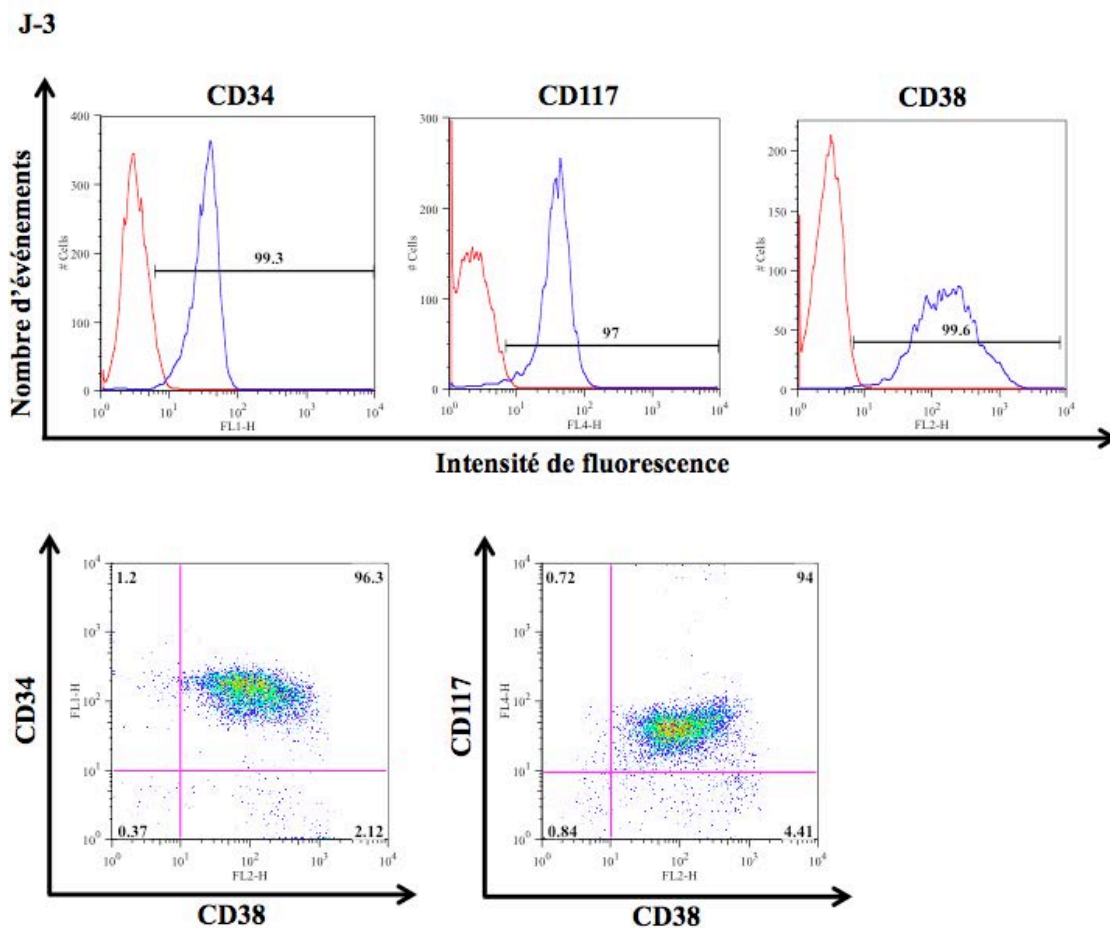


Figure 17 : Pureté en cellules CD34+ après enrichissement

Les cellules CD34+ isolées ont été analysées par cytométrie en flux directement après enrichissement (J-3) pour la présence de marqueurs (CD34, CD117 et CD38) caractéristiques des cellules souches progénitrices hématopoïétiques (CSH). Les doubles marquages (CD34/CD38 et CD117/CD38) effectués sur ces mêmes cellules révèlent la forte présence de populations CD34+CD38+ (96,3%) et CD117+CD38+ (94%), ce qui indique le bon rendement de la technique d'isolement. Une expérience représentative à partir de trois.

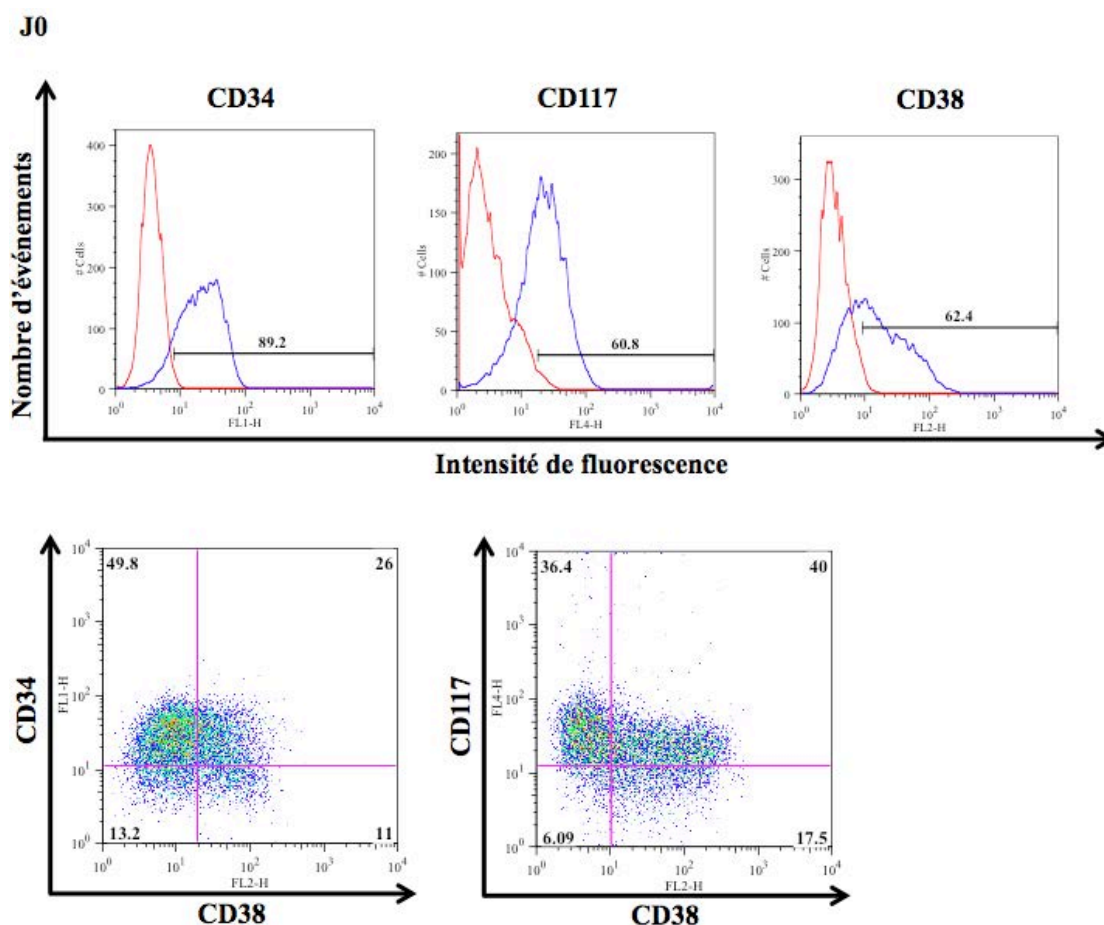


Figure 18 : Pureté de la culture en cellules souches progénitrices hématopoïétiques (CSH)

Les cellules mises en culture pendant trois jours (J0) dans le milieu contenant l'IL3 et le SCF ont été évaluées par cytométrie en flux pour la présence des marqueurs CD34, CD117 et CD38. Les doubles marquages (CD34/CD38 et CD117/CD38) effectués sur ces mêmes cellules révèlent qu'avant induction de l'érythropoïèse par l'Epo ou traitement par le $TNF\alpha$ elles présentent majoritairement des caractéristiques de CSH. Une expérience représentative à partir de trois.

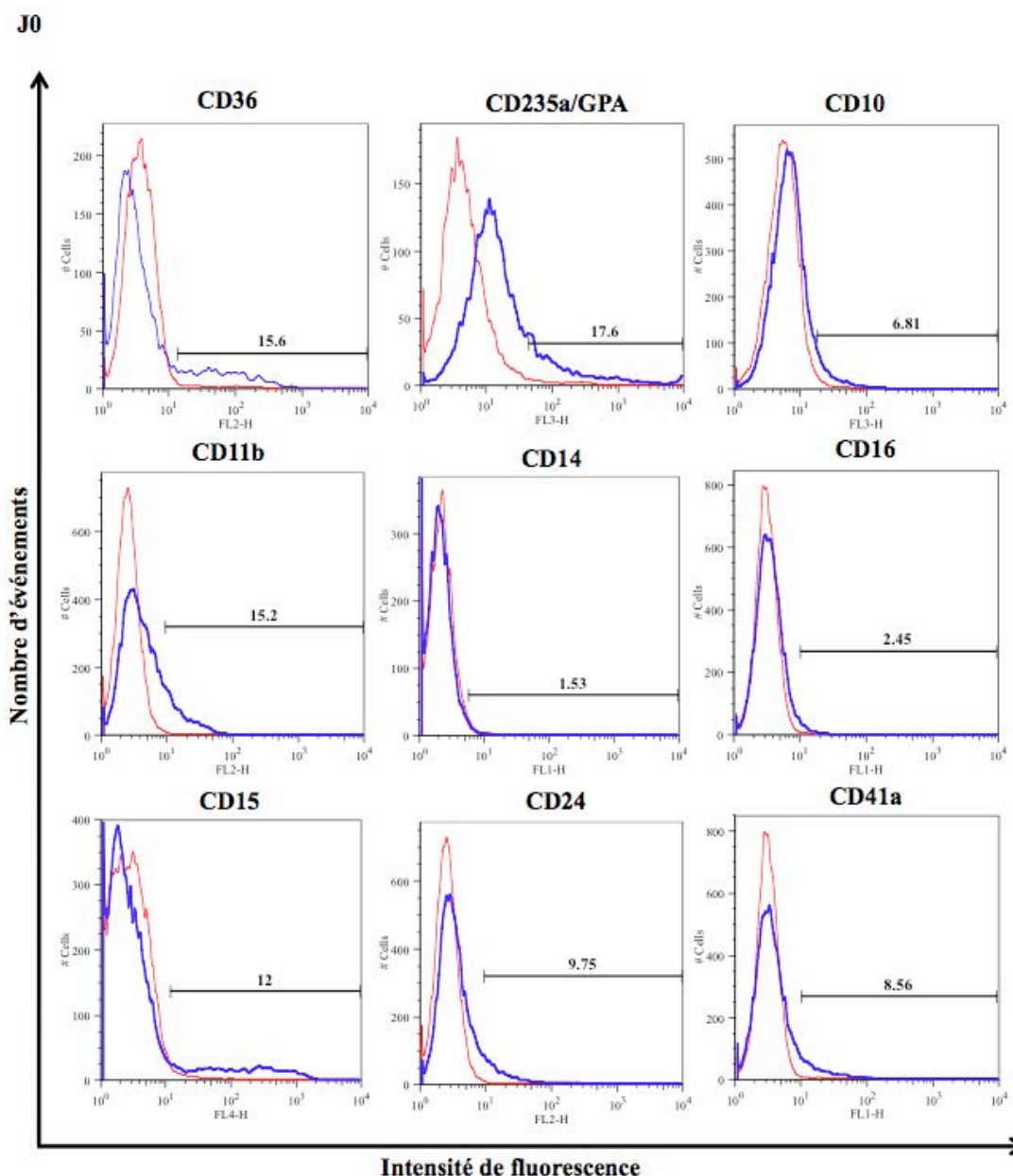


Figure 19 : Caractérisation de la population cellulaire avant stimulation/traitement

L'évaluation de l'hétérogénéité de la population cellulaire après trois jours (J0) de culture est effectuée par cytométrie en flux. Différents marqueurs spécifiques des précurseurs hématopoïétiques (CD10), des progéniteurs érythroïdes (CD36), des cellules érythroïdes (CD235a/GPA), des cellules mégacaryocytaires (CD41a) et myélo-monocytaires (CD11b, CD14, CD15, CD16 et CD24) ont été utilisés. Une expérience représentative à partir de trois.

4.1.2 Efficacité du milieu différenciant

Dans un premier temps nous avons utilisé la coloration au May-Grünwald Giemsa (MGG) pour vérifier l'efficacité du milieu différenciant (voir Matériels et Méthodes). La présence de cellules érythroïdes matures au cours de la culture témoigne de la capacité à reproduire les différents stades de l'érythropoïèse dans notre modèle de différenciation *in vitro*. La Figure 20 représente les cellules individualisées correspondant aux différents stades de l'érythropoïèse que nous avons observé et reproduit dans notre modèle de culture. Cette expérience démontre que les CSH CD34+ isolées à partir de sang de cordon peuvent se différencier en présence d'Epo dans ce milieu différenciant.

4.1.3 Capacité de réponse des cellules CD34+ au TNF α

Afin d'étudier l'effet du TNF α sur l'érythropoïèse, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34+ sont cultivées dans le milieu différenciant tel que décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Nous avons voulu vérifier la capacité des cellules CD34+ à répondre au TNF α dans notre système en prenant comme critère, l'activation du facteur de transcription NF- κ B (p50/p65). Nous avons réalisé l'expérience de gel retard sur des extraits nucléaires de CSH traitées pendant deux et trois jours (J2 et J3) et utilisé les cellules de la lignée K562 comme contrôle positif (trois jours de traitement au TNF α). L'incorporation des anticorps p50 et p65 dans le milieu réactionnel génère une immunodéplétion du complexe formé entre NF- κ B et la sonde oligonucléotidique, l'immunodéplétion se traduit par la disparition de la bande correspondant au dimère et confirme ainsi la présence de l'hétérodimère p50/p65 de NF- κ B après stimulation au TNF α (Figure 21). La présence de NF- κ B dans les extraits nucléaires des CSH traitées au TNF α atteste de leur capacité à répondre à la cytokine. Dans notre modèle, les cellules cultivées en présence d'Epo sont donc sensibles au TNF α .

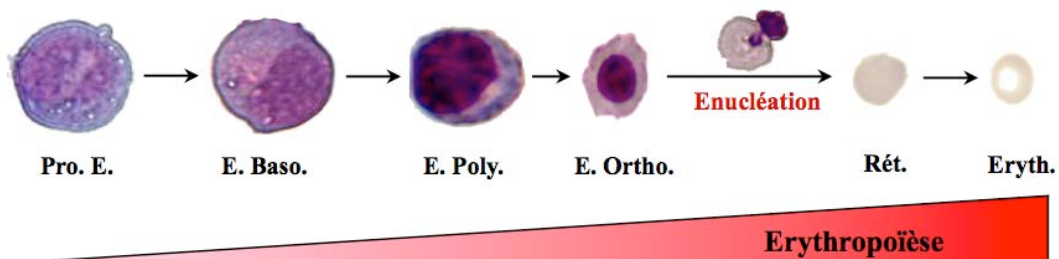


Figure 20 : Efficacité du milieu différenciant

L'efficacité du milieu différenciant est mise en évidence par coloration au MGG des cellules. Différents stades de l'érythropoïèse sont représentés par les cellules individualisées après culture dans le milieu différenciant en présence de l'Epo. Pro. E. : Proérythroblaste ; E. Baso : Erythroblaste Basophile ; E. Poly. : Erythroblaste polychromatophile ; E. Ortho. : Erythroblaste Orthochromatophile ; Rét. : Réticulocyte ; Eryth. : Erythrocyte.

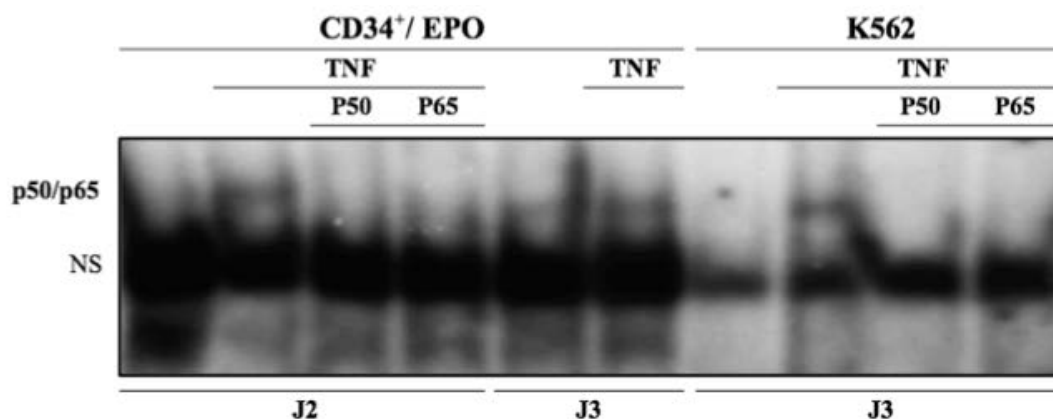


Figure 21 : Capacité de réponse au TNF α des cellules CD34+ en culture

Les cellules CD34+ ont été mises en culture dans le milieu différenciant (+Epo) et en présence de 20 ng/mL de TNF α pendant deux et trois jours. Les extraits nucléaires ont été analysés par gel retard à l'aide d'une sonde oligonucléotidique radio-marquée contenant la séquence spécifique de liaison du facteur NF- κ B (p50/p65). Les extraits de cellules K562 ont été utilisés comme contrôle positif. L'utilisation des anticorps anti-p50 (P50) et anti-p65 (P65) entraîne une immunodéplétion du complexe p50/p65 NF- κ B, permettant l'identification du dimère. Une expérience représentative à partir de trois. NS : non spécifique.

4.2 Influence du TNF α sur la survie des CSH en milieu différenciant

4.2.1 Effet sur la prolifération cellulaire

Afin de déterminer l'effet du TNF α sur la croissance et la viabilité cellulaire des CSH dans le milieu de culture en présence de 2 U/mL d'Epo, environ 4×10^5 cellules ont été traitées par 20 ng/mL de TNF α . Les cellules ont été dénombrées aux jours 2, 3 et 4 de culture en utilisant le test d'exclusion au bleu trypan pour évaluer la mortalité des cellules. Nous avons observé une stimulation de la prolifération cellulaire dans les cultures en présence de TNF α par rapport aux cultures contenant l'Epo seule. En effet, le nombre de cellules a augmenté d'un facteur 2 à J4 alors que la viabilité cellulaire est restée supérieure à 90% dans les deux conditions de culture. Les résultats suggèrent que le TNF α n'induit pas la mort des cellules et tend à promouvoir leur prolifération (Figure 22).

4.2.2 Effet sur l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose

Afin de mieux comprendre l'effet du TNF α sur la prolifération et la survie des CSH dans notre système, nous avons étudié l'expression de gènes impliqués d'une part dans la régulation du cycle cellulaire et d'autre part dans l'apoptose. Nous avons évalué les protéines activatrices du cycle cellulaire comme la cycline D1 et c-Myc ainsi que la protéine inhibitrice p27. De plus nous avons étudié l'expression des gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose comme les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1. Nous avons utilisé des extraits cytoplasmiques ou nucléaires de CSH après 4 jours de culture en présence d'Epo et traités ou non au TNF α . Les résultats ont montré une induction de l'expression de la cycline D1 et de c-Myc mais une inhibition de l'expression de p27 dans les cellules traitées au TNF α (Figure 23A). Ce résultat est en corrélation avec l'augmentation de la prolifération observée (Figure 22). L'expression de Mcl-1 augmente après 4 jours de traitement en accord avec l'absence de mort cellulaire. En revanche, l'expression de Bcl-xL ne semble pas être modifiée (Figure 23B).

4.2.3 Effet sur la voie JAK2/STAT5

La voie de signalisation JAK2/STAT5 est connue pour son rôle dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose, conduisant à la survie et à la prolifération cellulaire, notamment lors de l'hématopoïèse. Au vu des résultats concernant la prolifération des CSH et l'expression des protéines cycline D1, c-Myc, p27, Bcl-xL et Mcl-1, nous avons étudié l'effet du TNF α sur la phosphorylation des protéines JAK2 et STAT5 dans les CSH après 4 jours de traitement. Les résultats de western blot montrent que le TNF α induit la phosphorylation de ces deux protéines (Figure 24A). L'activation du facteur STAT5 par phosphorylation entraîne sa translocation vers le noyau, ce que nous avons pu vérifier par gel retard en utilisant des extraits nucléaires de CSH (CD34+) (Figure 24B). Après 3 jours de traitement au TNF α une bande correspondant au complexe formé entre STAT5 et la sonde oligonucléotidique apparaît, alors qu'elle n'est pas observée dans les extraits issus de CSH cultivées en présence de l'Epo seule. Ce résultat a été confirmé à J3 et J6 dans la lignée leucémique humaine TF1 qui est dépendante de l'Epo pour sa croissance, sa survie et sa différenciation. Il est à noter que l'Epo seule semble activer le facteur STAT5 plus tardivement, au 6ème jour de traitement (Figure 24B). Le gel retard révèle donc l'activation de STAT5 par le TNF α , puisqu'il est retrouvé dans le noyau où il exerce son activité de facteur de transcription.

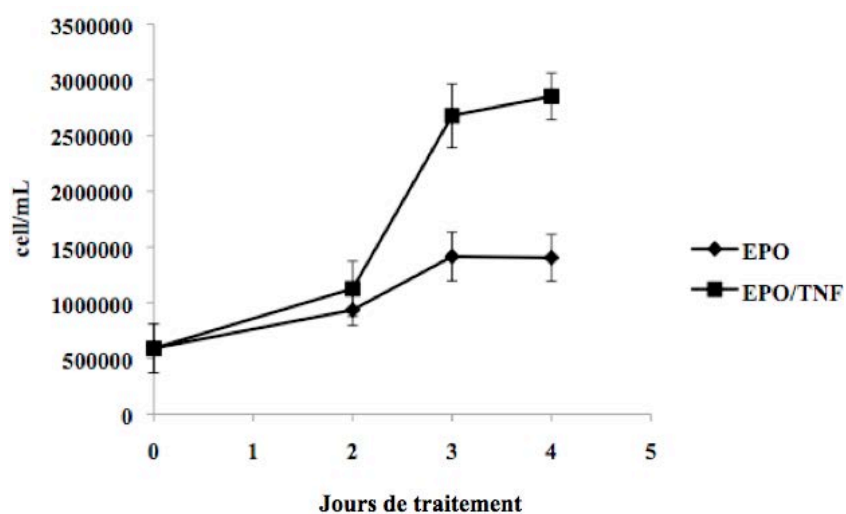
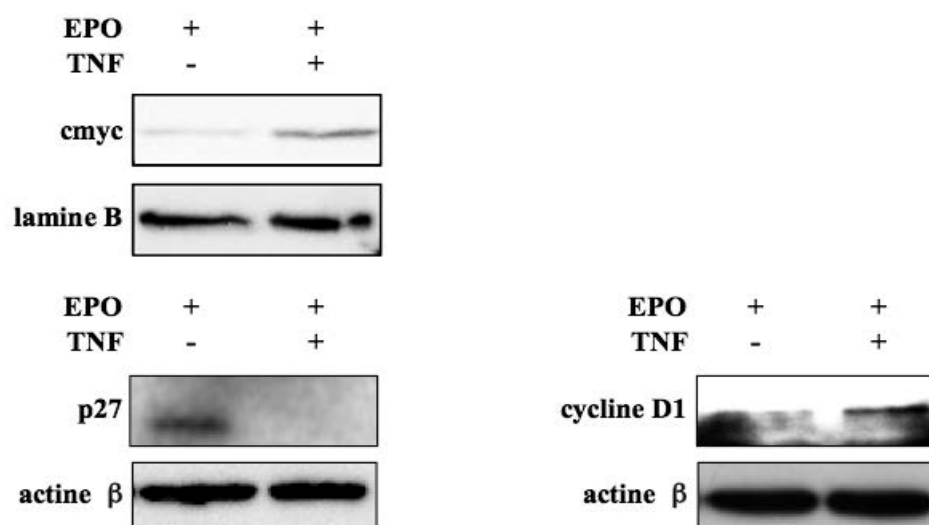


Figure 22 : Effet du TNF α sur la prolifération des CSH en milieu différenciant

L'évolution de la prolifération des cellules CD34+ traitées au TNF α (20 ng/mL) a été suivie en cours de culture. Les cellules prolifèrent plus rapidement en présence de TNF α (EPO/TNF) par rapport aux cellules cultivées dans le milieu différenciant seul (EPO).

A.



B.

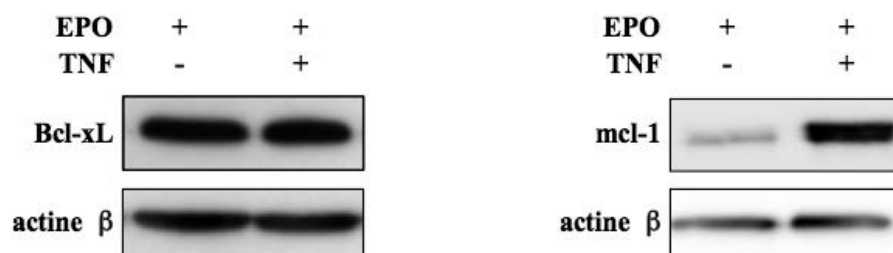
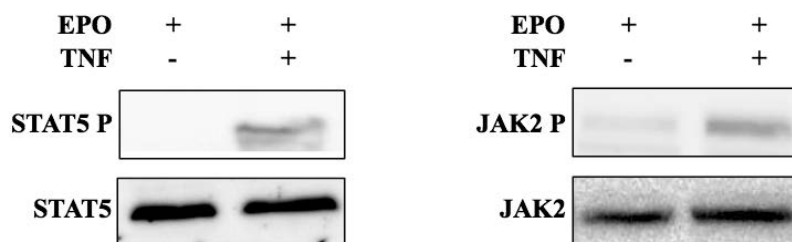


Figure 23 : Effet du TNF α sur l'expression de gènes régulateurs du cycle cellulaire et de l'apoptose

Western Blots réalisés à partir d'extraits protéiques totaux ou nucléaires (pour c-Myc) de CSH après 4 jours de culture. **A.** Expression des gènes régulateurs du cycle cellulaire (c-Myc, p27, cycline D1). **B.** Expression des gènes anti-apoptotiques (Bcl-xL et Mcl-1). L'actine β et la lamine B sont utilisées comme contrôle interne. Une expérience représentative à partir de trois.

A.



B.

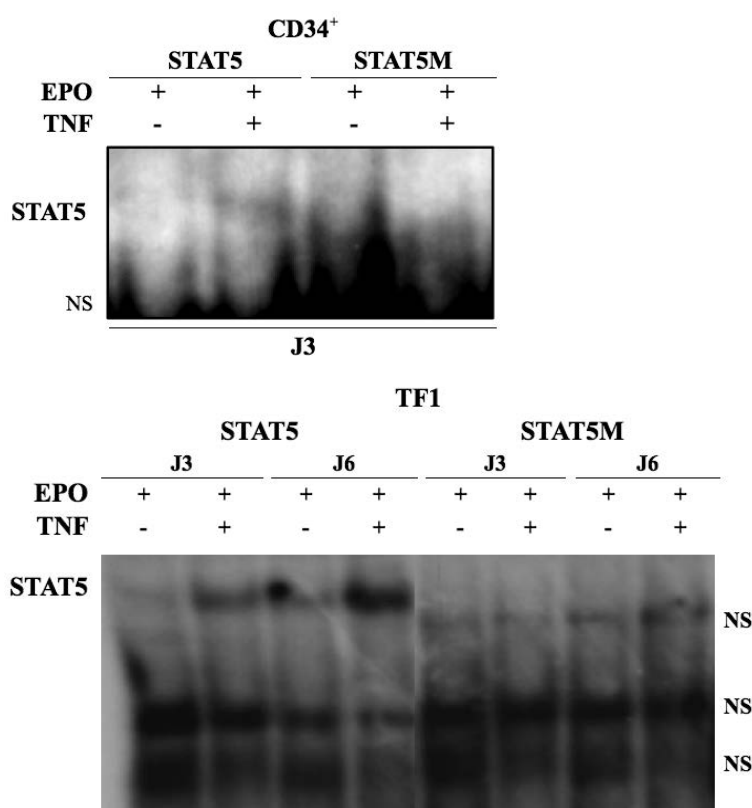


Figure 24 : Effet du TNF α sur la voie JAK2/STAT5

A. Western blots réalisés à partir d'extraits cytoplasmiques de CSH pour JAK2 et JAK2 phosphorylé (P) et nucléaires pour STAT5 et STAT5-P. Les cellules ont été traitées ou non avec TNF α (20 ng/mL) pendant 4 jours en présence d'Epo (2 U/mL). Une expérience représentative à partir de trois.

B. Gel retard : Les extraits nucléaires de CSH (CD34⁺) et de cellules TF1 traitées ou non traitées pendant 3 et 6 jours avec le TNF α (20 ng/mL) ont été analysés par gel retard à l'aide d'une sonde oligonucléotidique radiomarquée et contenant la séquence spécifique de liaison du facteur STAT5. La sonde mutée STAT5M dans le site spécifique de liaison est utilisée comme contrôle négatif pour identifier la bande correspondant à STAT5. Une expérience représentative à partir de trois. NS : Non spécifique.

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) isolées à partir de sang de cordon frais sont représentées par plus que 95% de cellules CD34+ à J-3. Le milieu spécifique additionné d'IL3 et de SCF, permet la survie, la prolifération et le maintien du statut de cellule souche, après trois jours de culture (J0). L'absence de cellules exprimant des marqueurs spécifiques de types cellulaires matures, indique que la population cellulaire en culture à J0 est constituée principalement de CSH. Les CSH cultivées en milieu différenciant (+Epo) ont la capacité de reproduire l'érythropoïèse avec les différents stades caractéristiques et de répondre à une stimulation par le TNF α comme l'indique l'activation de NF- κ B. Ce modèle expérimental est donc valide pour étudier l'effet du TNF α sur l'érythropoïèse.

Dans nos conditions de culture en présence d'Epo, le TNF α semble favoriser la prolifération et la survie des CSH, notamment en corrélation avec l'activation de la voie JAK2/STAT5. Cette prolifération a été corrélée à l'augmentation de l'expression du gène cible de STAT5, Cycline D1, ainsi que l'oncoprotéine c-Myc alors que l'expression du gène p27 est diminuée. De plus, le TNF α induit la protéine anti-apoptotique mcl-1, favorisant ainsi la survie des cellules.

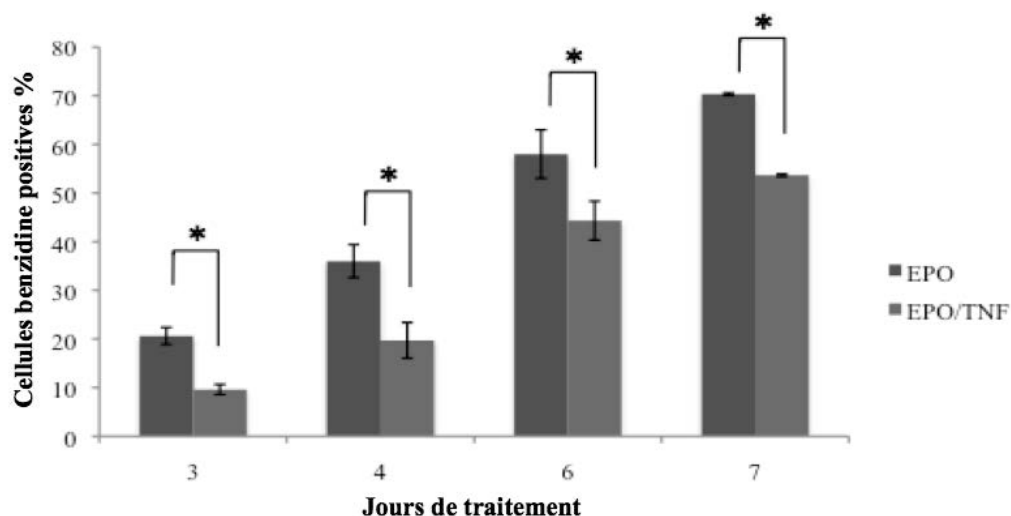
4.3 Effet du TNF α sur l'érythropoïèse au niveau cellulaire

4.3.1 Effet sur la production de l'hémoglobine

Les CSH ont été cultivées en présence de 2 U/mL d'Epo pendant plusieurs jours. Le test à la benzidine a été utilisé pour mettre en évidence la synthèse de l'hémoglobine dans les cellules stimulées à l'Epo. Nous avons ainsi évalué le taux de cellules capables de synthétiser de l'hémoglobine en présence ou non de 20 ng/mL de TNF α . La Figure 25A montre l'évolution du taux de cellules hémoglobinisées (benzidine positive B+) au cours du temps en présence d'Epo. Le pourcentage de cellules B+ est de 20% après 3 jours dans le milieu différenciant et atteint 70% après 7 jours. En revanche, le taux de cellules hémoglobinisées est réduit de manière significative lorsque les cellules sont traitées au TNF α , avec seulement 10% à J3 et 50% à J7 (Figure 25A). Ce résultat confirme que le TNF α inhibe l'action de l'Epo dans le processus d'hémoglobinisation. Il est à noter que l'effet du TNF α retarde le processus d'hémoglobinisation puisque le taux de cellules benzidine positives continue d'augmenter au cours du temps dans le cas des cellules traitées au TNF α .

Par ailleurs, la Figure 25B présente le taux d'inhibition de la production d'hémoglobine par le TNF α au cours du temps par rapport aux cellules contrôles (Epo). Ce taux, est calculé en utilisant la formule : $(\% E - \% ET) / \% E \times 100$ et prend donc en compte le pourcentage de cellules B+ stimulées à l'Epo (%E) et traitées au TNF α (%E/T). Les valeurs des benzidines sont calculées à différents jours au hasard tout au long de la culture. Les résultats montrent que le taux d'inhibition des cellules hémoglobinisées reste constant et est de $37 \pm 5 \%$ en moyenne (Figure 25B).

A.



B.

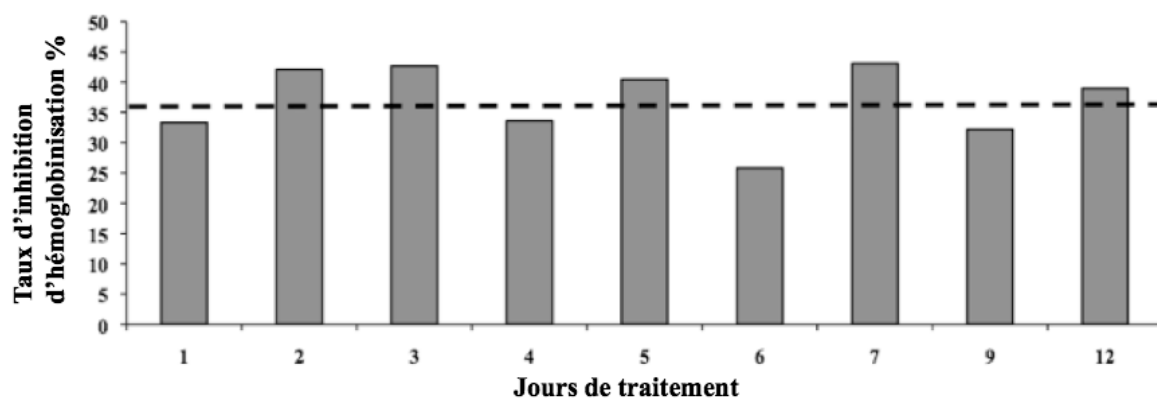


Figure 25 : Effet du $TNF\alpha$ sur le taux de cellules synthétisant de l'hémoglobine

A. Le taux des cellules CD34+ produisant de l'hémoglobine diminue après le traitement au $TNF\alpha$ par rapport aux cellules stimulées à l'Epo seule. Les données représentent la moyenne \pm l'écart type de cinq expériences indépendentes. L'astérisque indique que les données entre « traité » et « non traité » sont significativement différentes. Test de Student : * $P < 0,05$

B. Le taux d'inhibition de l'hémoglobination est en moyenne de 37% (ligne en pointillés). Il a été calculé en utilisant la formule suivante : $(\% E - \% ET) / \% E \times 100$; % E= pourcentage des cellules induites par l'Epo et capables de synthétiser de l'hémoglobine; % ET= pourcentage des cellules induites par l'Epo et traitées au $TNF\alpha$, capables de synthétiser de l'hémoglobine.

4.3.2 Profil phénotypique des CSH après traitement au TNF α

Nous avons réalisé des colorations MGG afin d'observer l'effet du TNF α sur la morphologie cellulaire. Les colorations sont réalisées sur des cellules CD34+ avant l'ajout de l'Epo (contrôle J0) et aux jours 2, 3, 5 et 8 après addition de l'Epo seule, ou en combinaison avec le TNF α . La Figure 26 montre des cellules en culture, soumises dans le milieu différenciant aux deux conditions de traitement, en absence et en présence de TNF α . Au jour 2, des proérythroblastes sont observés dans les deux cas. Au fil des jours, des érythroblastes plus matures apparaissent en présence d'Epo seule alors qu'ils sont absents lorsque l'Epo et le TNF α sont combinés. Au jour 3, nous observons des érythroblastes polychromatophiles en présence d'Epo seule. Au jour 5 des érythroblastes orthochromatophiles ou en cours d'énucléation apparaissent. Enfin, après 8 jours d'Epo, nous pouvons observer dans notre système d'érythropoïèse *in vitro*, la formation de réticulocytes (flèche orange). Les photos de cellules isolées sont représentées à la Figure 20. En revanche des proérythroblastes ainsi que des granulocytes sont observés à la suite du traitement au TNF α . Ces observations indiquent que les cellules CD34+, sous l'effet du TNF α , sont incapables de se différencier vers des stades plus matures de l'érythropoïèse (Figure 26). Ce résultat met également en évidence la capacité du TNF α d'agir directement sur les progéniteurs érythroïdes pour inhiber leur différenciation par l'Epo. De plus, ce résultat est en accord avec l'expression des marqueurs membranaires spécifiques (CD36 et GPA) de la voie de différenciation érythroïde observée par cytométrie en flux (Figure 27). Les résultats montrent que le pourcentage de cellules qui expriment ces marqueurs diminue de manière significative dans les cultures en présence de TNF α après 9 jours de traitement, de 44% pour CD36 et de 29% pour la GPA. Le taux d'expression des marqueurs par cellule exprimé en MFI est également diminué de 30% et de 60% pour le CD36 et la GPA respectivement (Figure 27). L'expression du marqueur GPA a été également étudiée par microscopie à fluorescence au cours de ces cultures. Les résultats confirment la diminution de l'expression de la GPA par les cellules traitées au TNF α après quatre jours de traitement (Figure 28).

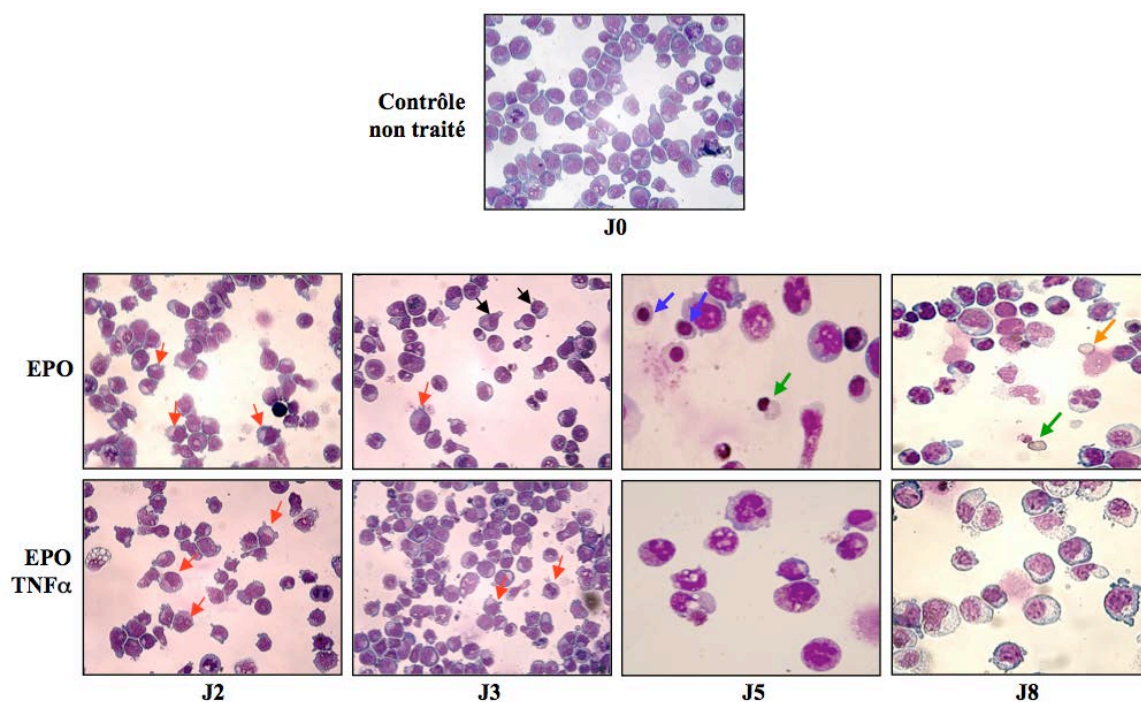


Figure 26 : Effet du $TNF\alpha$ sur la morphologie cellulaire en cours de différenciation

Les colorations MGG ont été effectuées au jour 0 (contrôle) avant traitement et aux jours 2, 3, 5 et 8. La flèche rouge indique des proérythroblastes, la flèche noire des érythroblastes polychromatophiles, la flèche bleue des érythroblastes orthochromatophiles, la flèche verte un érythrocyte en cours d'énucléation, et la flèche orange un réticulocyte. L'objectif utilisé est x40 pour les photos du contrôle et des jours 2 et 3 et x100 pour les photos des jours 5 et 8. Une photo représentative parmi six prises pour chaque jour de culture.

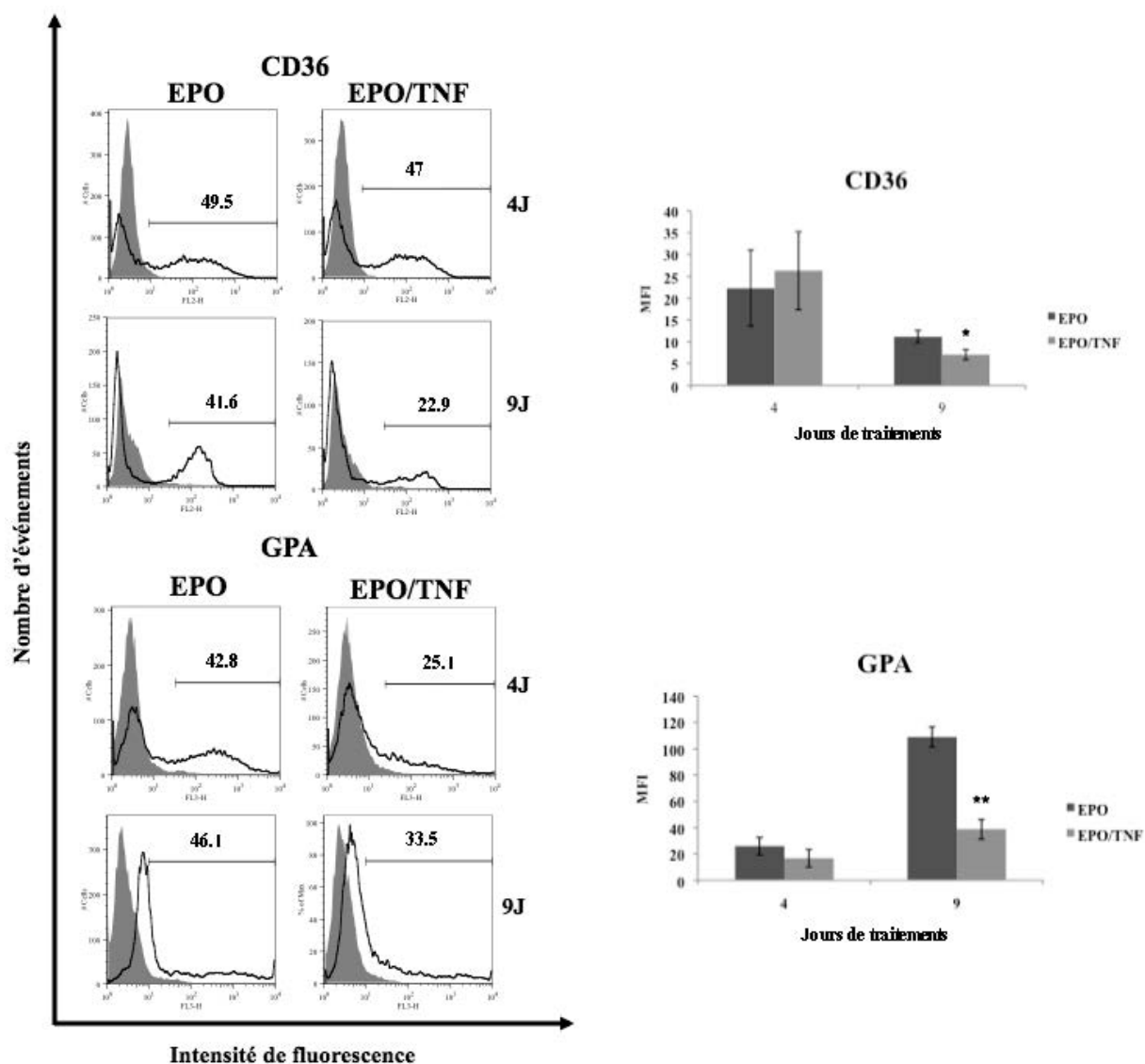


Figure 27 : Effet du TNF α sur les marqueurs de différenciation hématopoïétiques

Les cellules ont été traitées au TNF α pendant quatre (4J) et neuf jours (9J). Analyse par cytométrie en flux des marqueurs érythroïdes (CD36 et GPA). Les histogrammes (gauche ; nombre d'événements en fonction de l'intensité de fluorescence) correspondent à une analyse en cytométrie représentative de trois expériences indépendantes. Les histogrammes (gauche ; MFI (mean fluorescent intensity) en fonction du jour de traitement) correspondent à la moyenne \pm l'écart type des trois expériences indépendantes. Test de Student : *P<0,05 et **P<0,01.

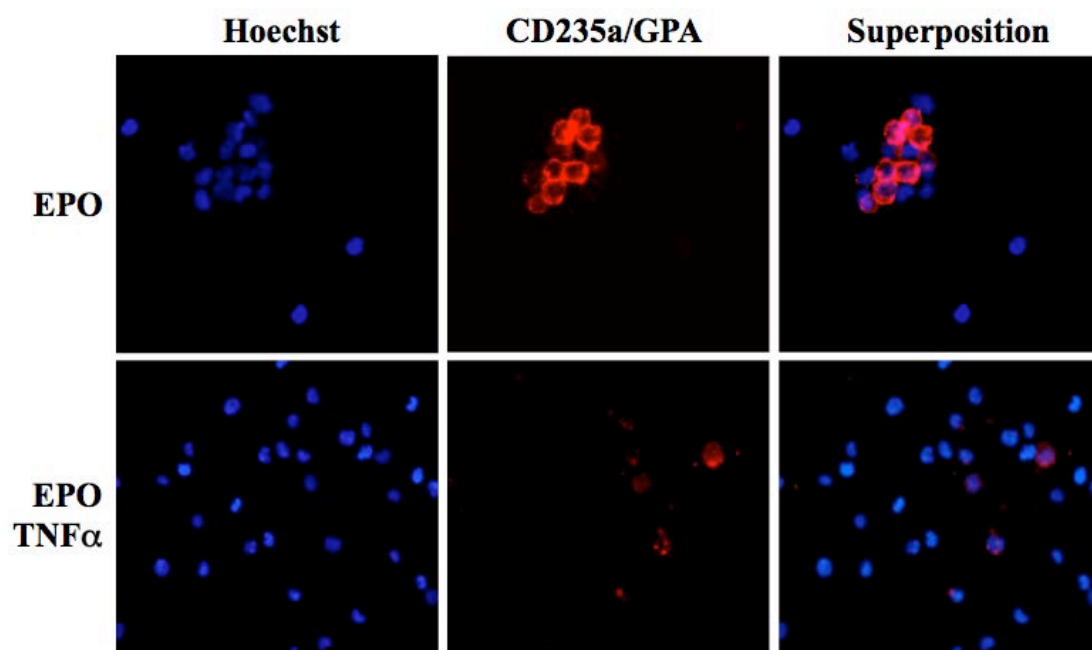


Figure 28 : Effet du TNF α sur l'expression de la GPA

L'expression de la glycophorine A (CD235a/GPA) par les cellules CD34+ différenciées à l'aide de l'Epo ou traitées au TNF α pendant quatre jours a été observée par microscopie à fluorescence. Une photo représentative parmi quatre prises pour chaque condition.

4.3.3 Impact du TNF α sur différentes voies de différenciation hématopoïétique

Les CSH CD34⁺ ont été traitées pendant 4 et 9 jours avec le TNF α (20 ng/mL) en présence d'Epo (2 U/mL). Les marqueurs phénotypiques myélo-monocytaire (CD11b), mégacaryocytaire (CD41a) et myélo-lymphocytaire (CD38) ont été analysés par cytométrie en flux. Les résultats montrent que le TNF α n'a pas d'effet significatif sur le taux de cellules exprimant des marqueurs spécifiques de la lignée mégacaryocytaire. La population des cellules exprimant le CD11b évolue au cours du temps et devient plus hétérogène avec le traitement au TNF α qu'avec l'Epo seule. En revanche, le TNF α induit une augmentation du pourcentage de cellules CD38⁺ de 50% et de l'expression du CD38 par cellule de 75% dès le jour 4 de traitement des CSH (Figure 29). Ces résultats sont en corrélation avec les cellules granulocytiques observées par MGG (Figure 26). Ainsi, la présence de TNF α dans le milieu de culture se traduit par un effet négatif sur la voie de différenciation érythroïde dans notre système. L'action inhibitrice du TNF α n'est pas un effet généralisé puisqu'il n'affecte pas négativement les autres voies testées.

Nous avons voulu vérifier la présence des cellules CD34⁺ au cours du traitement. Le marqueur CD34 est analysé par cytométrie en flux sur des cellules traitées ou non pendant 4 et 9 jours. Le traitement des CSH par le TNF α ne modifie pas de manière significative le pourcentage de cellules CD34⁺ par rapport à l'Epo seule. Cependant, ce pourcentage diminue au cours du temps dans les deux conditions de culture, traduisant un état différencié des cellules (Figure 30).

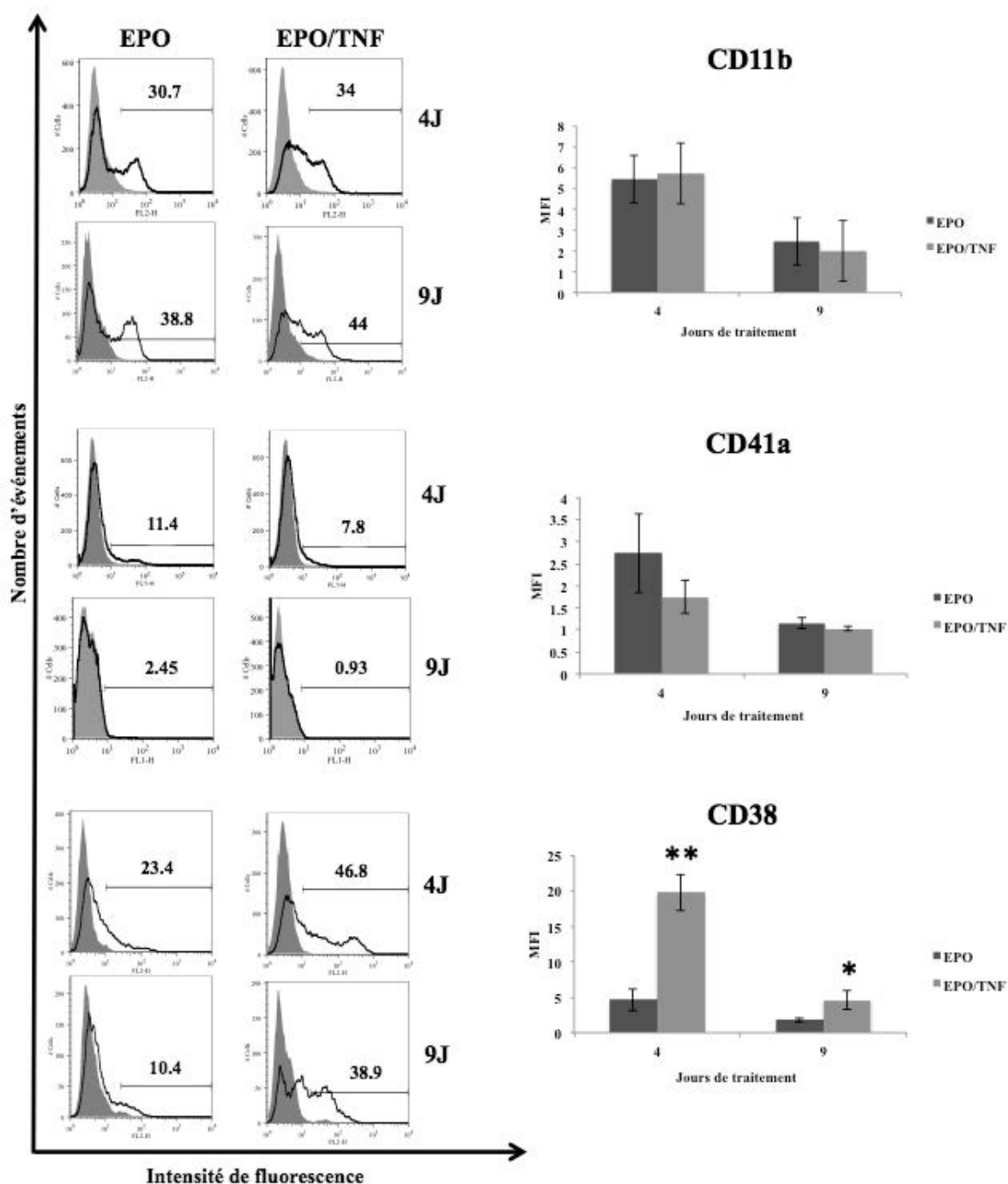


Figure 29 : Effet du TNF α sur différentes voies hématopoïétiques

Analyse de l'expression de différents marqueurs (CD11b, CD41a et CD38) par cytométrie en flux sur les CSH traitées pendant quatre (4J) et neuf (9J) jours avec ou sans TNF α . Les histogrammes (gauche ; nombre d'événements en fonction de l'intensité de fluorescence) correspondent à une analyse en cytométrie représentative de trois expériences indépendantes. Les histogrammes (gauche ; MFI (mean fluorescent intensity) en fonction du jour de traitement) correspondent à la moyenne \pm l'écart type des trois expériences indépendantes. Test de Student : *P<0,05 et **P<0,01.

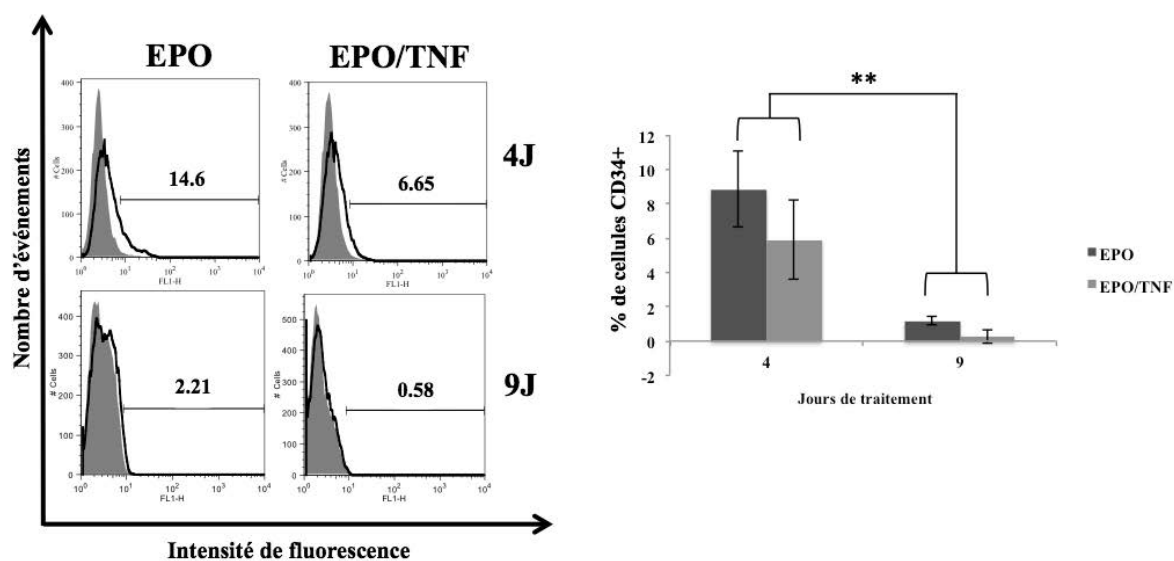


Figure 30 : Evolution du marqueur CD34 au cours du temps de culture

Evaluation par cytométrie en flux de l'évolution de la population des progéniteurs hématopoïétiques portant le marqueur CD34 (exprimé en pourcentage de cellules CD34+) après quatre (4J) et neuf jours (9J) de traitement au TNF α . Les histogrammes (gauche ; nombre d'événements en fonction de l'intensité de fluorescence) correspondent à une analyse en cytométrie représentative de trois expériences indépendantes. L'histogramme (gauche ; MFI (mean fluorescent intensity) en fonction du jour de traitement) correspond à la moyenne \pm l'écart type des trois expériences indépendantes. Test de Student : **P<0,01

Nous avons mis en évidence l'effet inhibiteur direct du TNF α sur l'érythropoïèse des progéniteurs érythroïdes CD34+ stimulés à l'Epo. Cette inhibition se traduit par une diminution du taux de cellules hémoglobinisées en présence du TNF α , par l'absence des modifications morphologiques qui caractérisent l'érythropoïèse et par la diminution de la présence de marqueurs érythroïdes spécifiques au cours du temps (CD36 et GPA). De plus, nous avons mis en évidence que l'effet inhibiteur du TNF α est particulier à la voie érythroïde alors que le pourcentage de cellules CD34+ diminue au cours du temps en présence ou en absence de TNF α , traduisant un état différencié des cellules. Dans notre système, la fonction de l'Epo semble être inhibée par le TNF α .

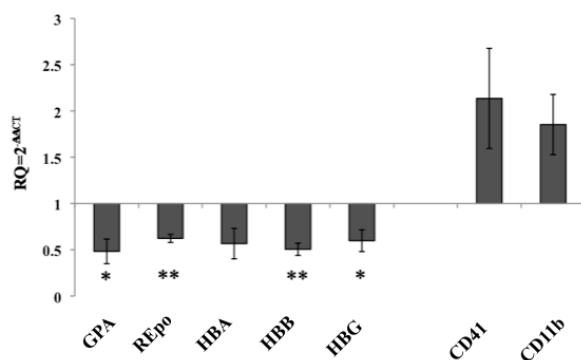
4.4 Effet du TNF α sur l'érythropoïèse au niveau moléculaire

4.4.1 Effet sur l'expression de gènes érythroïdes spécifiques

Suite aux résultats indiquant l'impact de la cytokine pro-inflammatoire sur l'érythropoïèse au niveau cellulaire, nous avons voulu vérifier son effet sur l'expression de gènes spécifiques des cellules érythroïdes. Nous avons réalisé des PCR en temps réel sur les ARN totaux isolés à partir de CSH traitées pendant 7 jours. Nous nous sommes intéressés à l'expression des gènes du récepteur à l'Epo (REpo), des globines α , β et γ (HBA α , HBB β et HBG γ respectivement), et de la Glycophorine A (GPA). Les résultats de PCR montrent une réduction générale et significative des ces gènes testés et spécifiquement impliqués dans l'expression du phénotype érythroïde. En revanche, l'expression des gènes non érythroïdes et spécifiques des macrophages et des monocytes tels que le CD41 et le CD11b, n'est pas affectée de manière significative (Figure 31A).

Afin de confirmer nos résultats de PCR en temps réel, nous avons étudié l'effet du TNF α sur l'expression protéique du REpo et des globines α , β et γ dans des extraits de protéines totales après 2, 3 et 4 jours de traitement (Figure 31B). Les résultats obtenus par Western blot montrent une diminution de l'expression de ces protéines, conformément aux résultats obtenus par PCR en temps réel. Cependant, l'expression de la γ globine semble retrouver un niveau équivalent aux cellules non traitées après quatre jours.

A.



B.

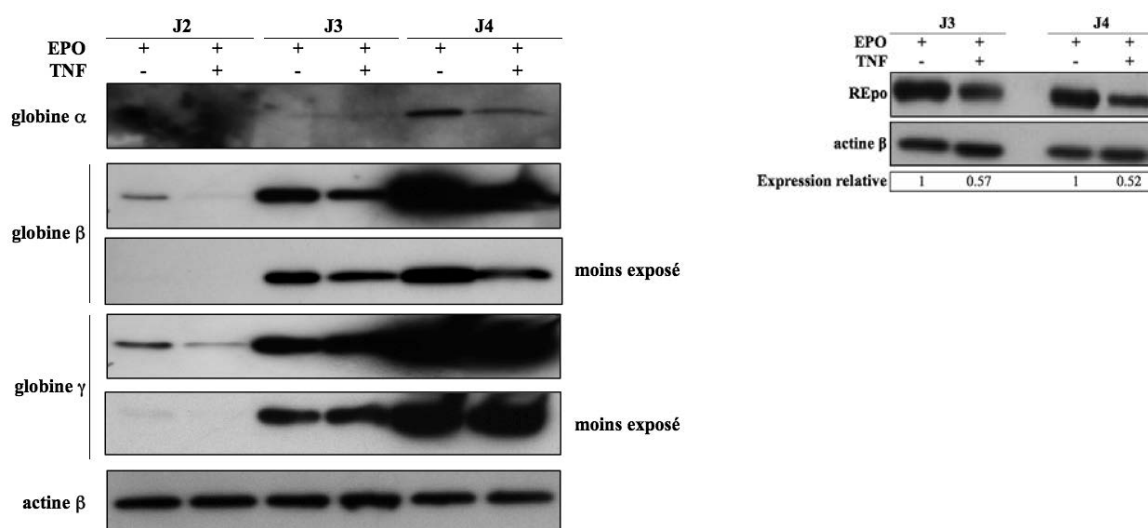


Figure 31 : Effet du TNF α sur l'expression des gènes érythroïdes: globines et REpo

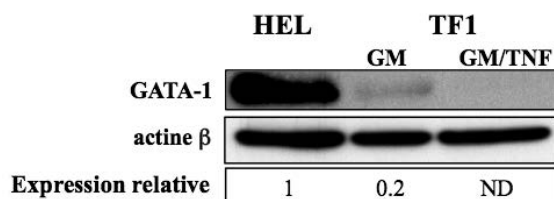
A. L'extraction des ARN totaux a été réalisée au 7^{ème} jour de culture de CSH traités avec ou sans 20 ng/mL de TNF α . Les résultats de la PCR en temps réel ont été normalisés par rapport au gène de ménage GAPDH, et calculés par la méthode du $\Delta\Delta CT$. GPA: Glycophorine A; REpo: récepteur de l'Epo; HB: hémoglobine; globines α , β et γ (HBA α , HBB β et HBG γ). Les données représentent la moyenne \pm l'écart type calculées à partir de quatre expériences indépendantes. Test de Student *P<0,05 et **P<0,01.

B. Western blot réalisés à partir d'extraits de protéines totales de CSH après 2, 3 et 4 jours de traitement ou non au TNF α (20 ng/mL). Une expérience représentative parmi trois.

4.4.2 Effet sur l'activité transcriptionnelle de GATA-1

Compte tenu du rôle-clé du facteur de transcription GATA-1 dans le développement de l'érythropoïèse, de la diminution de l'expression de ses gènes cibles décrits à la Figure 31 et des résultats obtenus précédemment sur les lignées cellulaires (Morceau *et al.* 2006; Buck *et al.* 2008; Buck *et al.* 2009), nous avons étudié l'effet du TNF α sur son activité transactivatrice. Pour ce faire, nous avons utilisé la lignée érythroleucémique humaine TF1, dépendante de l'Epo. En absence d'Epo, le niveau protéique basal d'expression de GATA-1 dans cette lignée est très faible comme le montre la Figure 32A, en comparaison avec celle de la lignée humaine érythroleucémique, HEL. Nous avons transfecté les cellules TF1 avec le vecteur d'expression pXM-GATA1 afin qu'elles expriment une protéine GATA-1 exogène. Ceci permet d'observer l'effet du TNF α sur l'activité du facteur indépendamment de son niveau d'expression. Le plasmide rapporteur pGL3-GATA-Luc qui contient trois séquences GATA en amont du gène de la luciférase (Luc) a été co-transfecté. L'activité transactivatrice de GATA-1 a été évaluée en présence ou en absence de TNF α . La Figure 32B montre une augmentation de deux fois l'activité Luc après surexpression de GATA-1 par rapport aux cellules non transfectées. Après 2 h de traitement au TNF α , nous observons une diminution de l'activité Luc qui traduit l'effet inhibiteur de la cytokine sur l'activité transcriptionnelle de GATA-1 (Figure 32B).

A.



B.

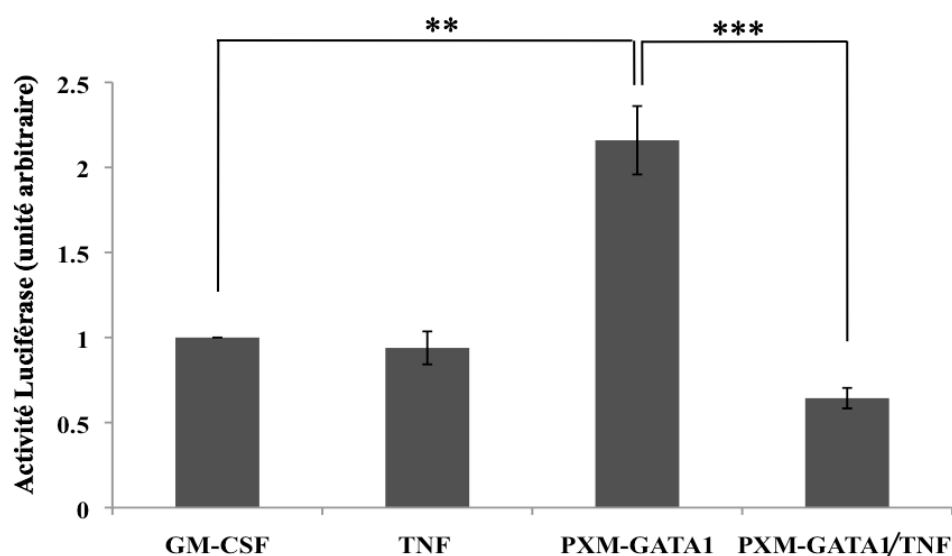


Figure 32: Effet du $TNF\alpha$ sur l'activité transcriptionnelle de GATA-1

A. Western blot réalisé à partir d'extraits protéiques nucléaires de cellules TF1 cultivées en présence de GM-CSF (GM) ou GM-CSF et $TNF\alpha$ (GM/TNF). Des extraits nucléaires de cellules humaines d'érythroleucémie (HEL) ont été utilisés en tant que contrôle positif d'expression de GATA-1. ND : non déterminé

B. Activité relative de la Luciférase après transfection des cellules TF1 avec pGL3-GATA-Luc. L'expression de GATA-1 est obtenue par cotransfection du vecteur d'expression pXM-GATA-1. Les cellules transfectées sont traitées au $TNF\alpha$ (20 ng/mL) pendant 2 heures. Les activités Luciférase (firefly pour l'activité de GATA-1 et Renilla utilisée comme contrôle interne) sont évaluées par luminométrie. Les données représentent la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Test de Student ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$

4.4.3 Effet sur l'expression des facteurs de transcription hématopoïétiques : GATA-1, GATA-2, PU.1

Les résultats de transfections obtenus avec les cellules TF1 ont suggéré un rôle potentiel de GATA-1 dans le mécanisme d'inhibition de l'érythropoïèse par le TNF α . Nous avons souhaité étudier l'effet du TNF α sur l'expression du facteur GATA-1 dans les CSH. Les analyses de l'expression de l'ARNm de GATA-1 par PCR montrent une augmentation significative de 1,4 fois après 4 jours de traitement (Figure 33). Des extraits nucléaires obtenus aux jours 2, 3 et 4 de traitement au TNF α confirment par western blot l'augmentation de l'expression de la protéine (Figure 34). Compte tenu du rôle-clé du facteur GATA-1 dans la régulation de l'expression des gènes érythroïdes, le maintien constant du niveau d'expression élevé de GATA-1 en concomitance avec l'inhibition de l'érythropoïèse, apparaît contradictoire. Cependant nous avons vu par transfection que son activité transactivatrice était inhibée en présence de TNF α . Nous avons alors analysé l'expression des gènes de facteurs de transcription qui régulent négativement l'érythropoïèse tels que GATA-2 et PU.1, un cofacteur de GATA-1 qui inhibe son activité. Ces deux facteurs sont également impliqués dans la stimulation de la prolifération cellulaire, phénomène que nous avons pu observer en présence de TNF α . Les résultats de PCR en temps réel montrent que le traitement des CSH au TNF α , induit une augmentation significative de 2,7 et 2,5 fois de l'expression des ARNm de GATA-2 et PU.1 après 4 jours (Figure 33). Au vu de ces résultats, nous avons étudié l'effet du TNF α sur ces deux protéines après 2, 3 et 4 jours de traitement (Figure 35). En accord avec les résultats de PCR, l'expression des protéines GATA-2 et PU.1 est augmentée dès le jour 2 et se maintient jusqu'au jour 4.

Afin de vérifier si l'effet du TNF α sur l'expression des facteurs de transcription est dépendant du milieu de culture utilisé, les CSH ont été cultivées dans un deuxième milieu de culture commercial (milieu différenciant 2) (cf. matériels et méthodes) dans les mêmes conditions que dans le milieu 1. L'expression de GATA-1 a été analysée dans les CSH cultivées dans le milieu 2 et celle-ci ne varie pas de manière significative après traitement au TNF α . En revanche, comme dans le milieu 1, l'expression de GATA-2 et de PU.1 est augmentée (Figure 36). Quelque soit le milieu utilisé, l'expression des protéines GATA-2 et PU.1 est donc augmentée, suggérant que l'effet inhibiteur du TNF α est corrélé à une surexpression de ces deux facteurs nucléaires. Ce résultat montre que le niveau d'expression de GATA-1 n'est pas en

cause dans l'effet du TNF α mais plutôt son activité transcriptionnelle, ce qui est en accord avec les résultats des expériences de transfections.

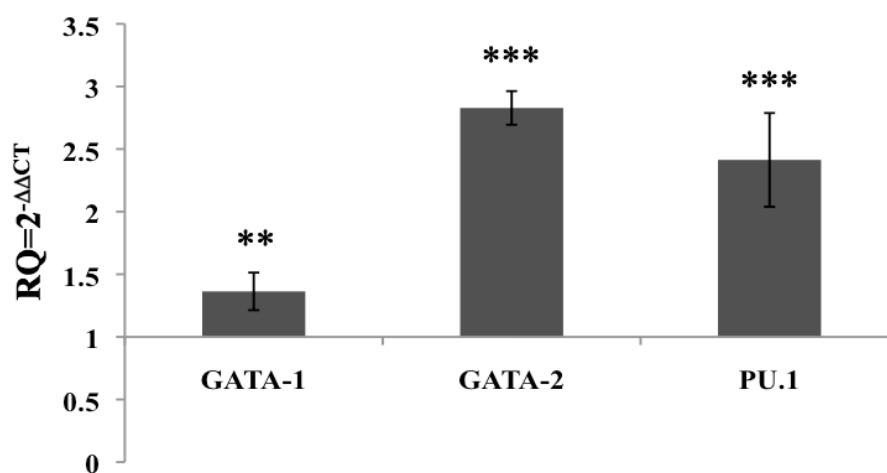


Figure 33: Effet du TNF α sur l'expression des gènes des facteurs de transcription : GATA-1, GATA-2 et PU.1

PCR en temps réel pour l'expression des gènes de GATA-1, GATA-2 et PU.1. L'extraction des ARN totaux a été réalisée au jour 7 de la culture des CSH traitées avec ou sans 20 ng/mL de TNF α . Les résultats ont été normalisés par rapport aux gènes de ménage S14 et GAPDH et calculés par la méthode du $\Delta\Delta C_T$. Les données représentent la moyenne \pm l'écart type de quatre expériences indépendantes. L'expérience a été réalisée quatre fois. Test de Student : **P<0,01 et ***P<0,001

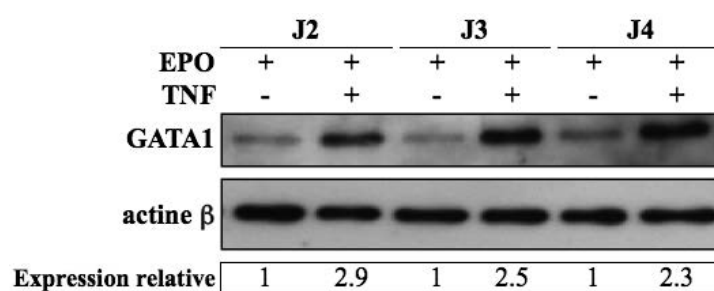


Figure 34 : Effet du TNF α sur l'expression protéique du facteur de transcription: GATA-1

Western blot réalisé à partir d'extraits protéiques nucléaires de CSH après traitement pendant 2, 3 et 4 jours avec 20 ng/mL de TNF α . L'actine β est utilisée comme contrôle interne. Une expérience représentative parmi trois.

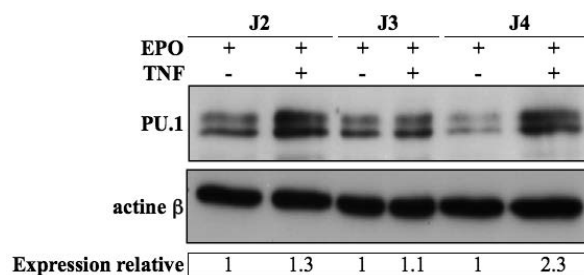
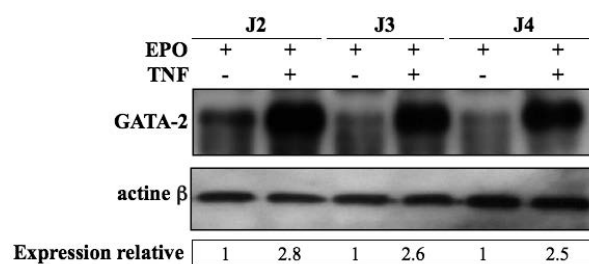


Figure 35: Effet du TNF α sur l'expression protéique des facteurs de transcription GATA-2 et PU.1

Western blots réalisés à partir d'extraits protéiques nucléaires de CSH après 2, 3 et 4 jours de traitement avec 20 ng/mL de TNF α . L'actine β est utilisée comme contrôle interne. Une expérience représentative parmi trois.

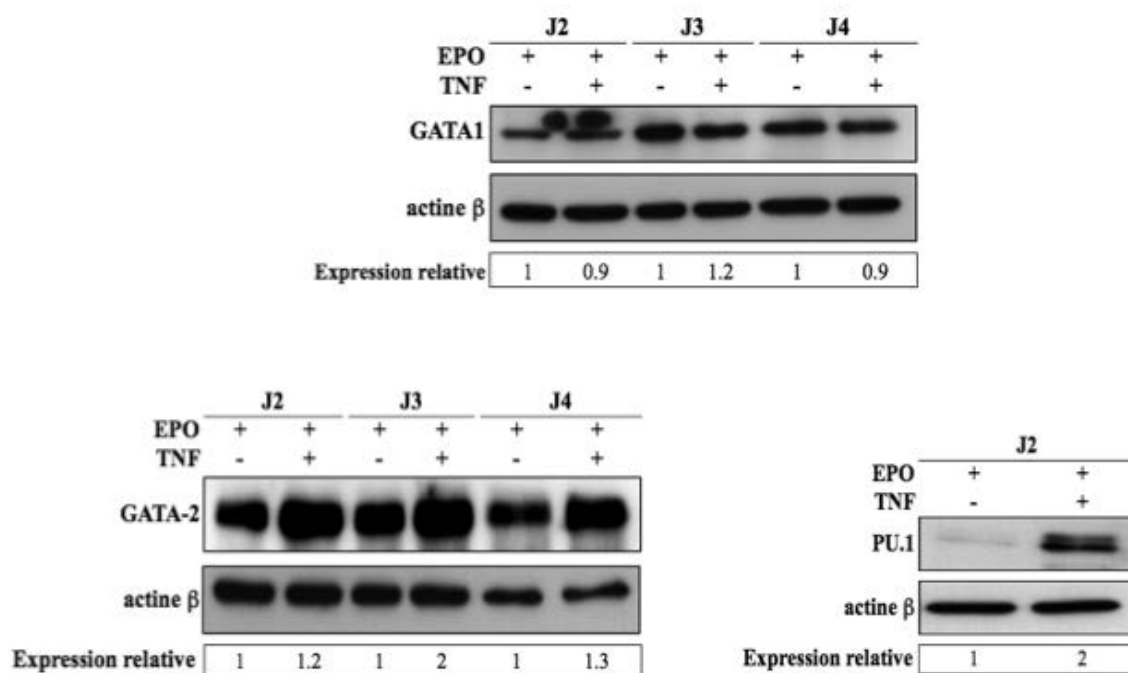


Figure 36 : Effet du TNF α dans un le milieu différenciant 2

Western blots réalisés à partir d'extraits protéiques nucléaires de CSH après traitement pendant 2, 3 et 4 jours avec 20 ng/mL de TNF α dans un milieu différenciant d'origine commerciale différente (milieu 2). L'actine β est utilisée comme contrôle interne. Une expérience représentative parmi trois.

4.4.4 Effet sur l'interaction GATA-1/PU.1

Afin de corrélérer l'inhibition de l'érythropoïèse à l'inactivation de GATA-1 et l'augmentation de l'expression de PU.1 dans les cellules traitées au TNF α , nous avons voulu évaluer par immunoprécipitation protéique l'interaction de GATA-1 avec PU.1. Cette interaction est connue pour bloquer la liaison de GATA-1 avec les séquences *cis*-régulatrices de ses gènes cibles. Nous avons immunoprécipité GATA-1 dans des extraits nucléaires (et cytoplasmiques comme contrôle négatifs) de CSH traitées ou non traitées au TNF α , en présence d'Epo. Les facteurs GATA-1 d'une part et PU.1 d'autre part, ont été révélés par western blot. Des anticorps anti-GATA-1 (IgG) d'origines animales différentes ont été utilisés pour l'immunoprécipitation et le western blot. Ceci permet d'éviter les réactions croisées avec l'anticorps secondaire qui reconnaît alors spécifiquement l'anticorps anti-GATA-1 utilisé en western blot mais pas celui utilisé pour l'immunoprécipitation présent sur la membrane. Le résultat montre qu'après quatre jours de traitement des CSH avec le TNF α , GATA-1 et PU.1 co-immunoprécipitent (Figure 37). Cette expérience suggère une inhibition de l'activité transcriptionnelle de GATA-1 et donc de l'érythropoïèse.

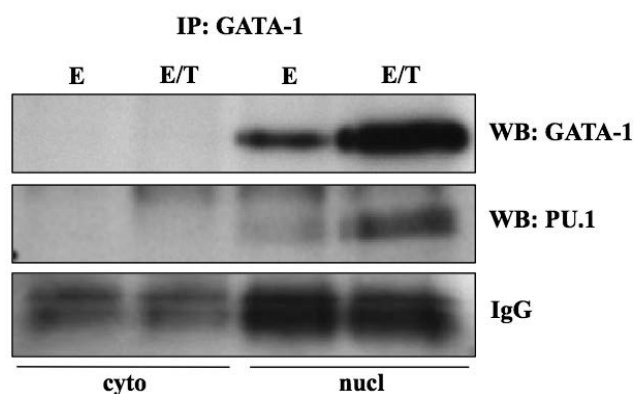


Figure 37: Evaluation de l'interaction GATA-1/PU.1

200 µg de protéines d'extrait nucléaires et cytoplasmiques (J4) sont utilisés pour l'immunoprécipitation de GATA-1 afin de vérifier sa co-immunoprécipitation avec PU.1. L'immunoprécipitation est suivie d'un western blot utilisant des anticorps dirigés contre PU.1 et GATA-1. L'anticorps anti-IgG de chèvre est utilisé comme contrôle. Une expérience représentative parmi trois.

4.4.5 Expression des gènes spécifiques de la voie érythroïde dans des cellules érythroïdes GPA+ différenciées en présence du TNF α

Nous avons mis en évidence que le TNF α inhibe le développement des cellules érythroïdes dans notre système. Cependant, les résultats de Benzidine, de cytométrie en flux et de microscopie à fluorescence ont montré que cette inhibition n'est pas totale puisque des cellules hémoglobinisées et GPA+, bien qu'en faible quantité apparente, sont encore présentes après traitement au TNF α . Nous avons voulu déterminer si l'expression des gènes spécifiques de la voie érythroïde et des facteurs de transcription pouvaient être affectée dans les cellules différenciées ayant été en contact avec le TNF α . Les CSH CD34+ ont été cultivées pendant 9 jours en milieu différenciant en présence ou en absence de TNF α . Les cellules GPA+ ont ensuite été isolées et les extraits cytoplasmiques et nucléaires analysés par western blot. Les résultats indiquent que l'expression des gènes de globines (α , β , γ) est réduite dans les cellules GPA+ qui ont été en contact avec le TNF α . L'expression du facteur GATA-2 n'est pas modifiée alors que celle de GATA-1 et de PU.1 reste élevée comme dans les extraits issues de culture de CD34+ après traitement (Figure 38). Ceci suggère que ces cellules GPA+ expriment des marqueurs phénotypiques érythroïdes mais que la cytokine pro-inflammatoire a cependant limité ou ralenti l'expression des gènes érythroïdes cibles de GATA-1 dans ces cellules.

4.4.6 Effet du TNF α sur des cellules engagées dans la voie de différenciation érythroïde

L'inhibition de l'érythropoïèse dans notre système a été observée à partir de populations cellulaires CD34+. Afin de vérifier si le TNF α pouvait exercer son activité inhibitrice de l'érythropoïèse sur des cellules érythroïdes déjà engagées dans la voie de différenciation, nous avons choisi d'isoler les cellules GPA+ issues du sang de cordon avant tout traitement *in vitro*. Ces cellules ont été mises en culture dans le milieu différenciant en présence ou non de TNF α pendant quatre jours. L'expression des gènes de globines et des facteurs GATA-1, GATA-2 et PU.1 a été analysée par Western blots. Les résultats ont révélé une augmentation de l'expression de GATA-2 et de PU.1 dans les cellules cultivées en présence de TNF α , suggérant que celui-ci agit sur les facteur régulant l'érythropoïèse des cellules érythroïdes déjà engagées dans la voie de différenciation. Au contraire, aucun effet n'est observé sur l'expression des globines déjà présentes, ce qui est en accord avec la stabilité des ARNm de globines (Ji *et al.*

2007). Ces résultats confirment l'action spécifique et directe du TNF α sur les cellules érythroïdes (Figure 39).

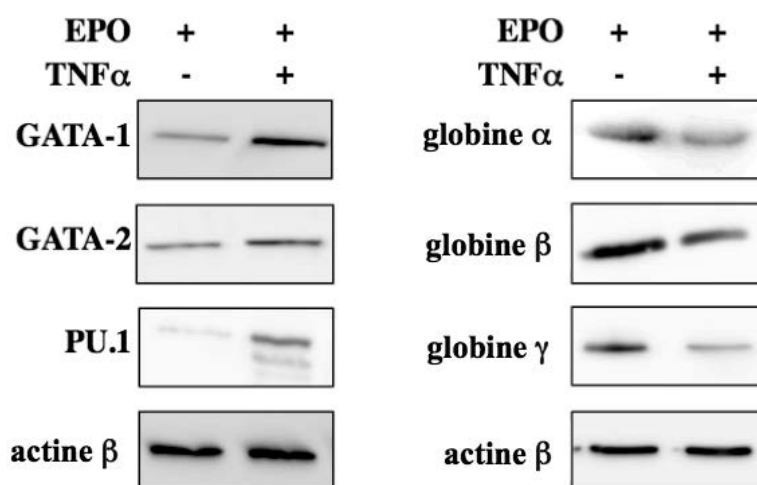


Figure 38 : Expression des gènes de globines et des facteurs de transcription dans des cellules différenciées en présence de TNF α

Les cellules CD34⁺ ont été isolées et cultivées en milieu différenciant en présence ou en absence de 20ng/mL de TNF α pendant 9 jours. Les cellules GPA⁺ ont été isolées et les extraits nucléaires (GATA-1, GATA-2, PU.1) et cytoplasmiques (globines) ont été analysés par western blot. L'actine β est utilisée comme contrôle interne. Une expérience représentative parmi trois.

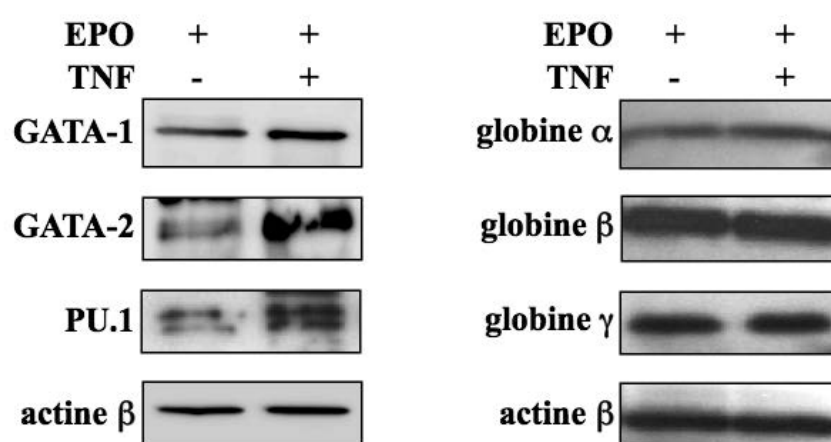


Figure 39 : Effet du TNF α sur des cellules érythroblastiques

Western blots réalisés à partir d'extraits de protéines nucléaires (GATA-1, GATA-2, PU.1) et de protéines cytoplasmiques (globines) de cellules GPA+ après 4 jours de traitement au TNF α (20 ng/mL). L'actine β est utilisée comme contrôle interne. Une expérience représentative parmi trois.

Au niveau moléculaire, l'expression des gènes érythroïdes étudiés diminue en corrélation avec les résultats obtenus au niveau cellulaire montrant l'inhibition de l'érythropoïèse. De même, l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de GATA-1 dans les cellules TF1 par le TNF α va dans le sens d'une déficience de l'activité transactivatrice de ce facteur. Dans les CSH traitées par le TNF α , l'expression de GATA-1 est modulée en fonction du milieu de culture utilisé. Ces résultats suggèrent que le TNF α n'exerce pas son activité inhibitrice à travers l'expression de GATA-1 mais potentiellement par son activité. En revanche, l'expression des inhibiteurs de l'érythropoïèse, PU.1 et GATA-2 est stimulée par le TNF α et ceci dans les deux milieux différenciants. L'interaction de GATA-1 avec son inhibiteur PU.1 est augmentée. Les résultats vont dans le sens d'une inhibition de l'activité transcriptionnelle de GATA-1, induite par le TNF α . De plus, le TNF α agit directement sur les cellules érythroïdes et le processus de différenciation puisque son effet inhibiteur est similaire dans des cellules érythroïdes isolées (GPA+), avec une augmentation des facteurs GATA-2 et PU.1.

4.5 Implication de la p38MAPK dans l'effet inhibiteur du TNF α

4.5.1 Corrélation entre l'activation de p38MAPK et l'hémoglobination des CSH

Les études réalisées par Buck *et al.*, sur des lignées érythroleucémiques humaines, avaient montré un rôle potentiel de la p38MAPK dans l'inhibition de l'érythropoïèse induite par le TNF α (Buck *et al.* 2008). Nous avons vérifié l'effet de l'inhibiteur spécifique de la p38MAPK (SB203580 ou SB) sur l'inhibition de l'érythropoïèse par le TNF α dans notre système. Les CSH ont été prétraitées avec 10 μ M de SB pendant une heure avant l'addition du TNF α (20 ng/mL) pendant trois jours. Nous avons évalué le taux de cellules hémoglobinisées (cellules benzidine positives) dans les différentes conditions de traitement. Les résultats montrent que le pourcentage de cellules différenciées obtenu dans les cultures contrôles (Epo) est restitué lorsque le SB est présent en même temps que le TNF α . Cette expérience démontre que le SB inverse en partie l'effet inhibiteur du TNF α sur la production de l'hémoglobine (Figure 40A).

4.5.2 Effet d'un inhibiteur de p38MAPK sur l'expression de REpo

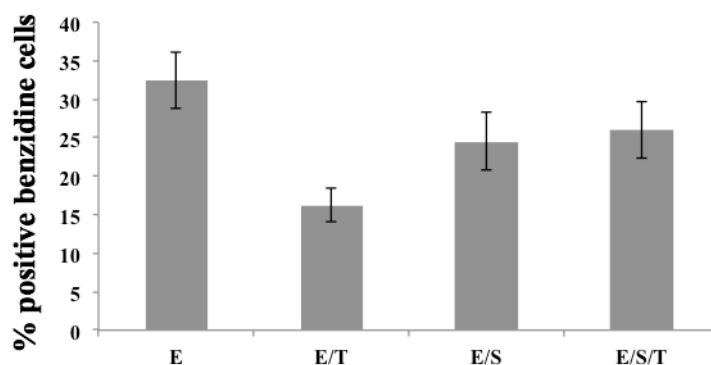
Afin de confirmer l'activation de p38 par phosphorylation dans notre système, les CSH ont été prétraitées une heure au jour 0 de la culture au TNF α et stimulées pendant 30 min avec de l'Epo. Nous avons analysé l'expression de la p38MAPK et de sa forme phosphorylée par western blot. Contrairement à l'Epo qui réduit l'activation de la p38 par rapport aux cellules témoins non traitées (avant addition d'Epo et de TNF α), les résultats montrent que le TNF α induit une forte et rapide augmentation de la phosphorylation de p38 après 1,5 h de traitement dans les CSH (Figure 40B).

Nous avons confirmé l'implication de cette voie dans l'effet inhibiteur du TNF α sur les CSH, en utilisant l'inhibiteur spécifique de p38, SB. Le SB a été ajouté une heure avant le TNF α . Les extraits protéiques réalisés après trois jours de traitement ont été utilisés pour évaluer l'expression du récepteur de l'Epo (REpo). Les résultats montrent que l'inhibition de l'activation de p38 prévient l'effet inhibiteur du TNF α sur l'expression du REpo. De plus, le SB seul est capable d'induire une augmentation de 2,3 fois de l'expression de la protéine REpo (Figure 40B).

4.5.3 Effet de l'inhibition de p38MAPK sur l'interaction GATA-1/PU.1

Afin de corréler le rôle de la p38 dans l'inhibition de l'érythropoïèse par le TNF α et l'interaction de GATA-1 avec son inhibiteur PU.1, nous avons analysé l'effet du SB sur la formation du complexe GATA-1/PU.1 dans les CSH traitées au TNF α . Nous avons prétraitées les CSH une heure avec 10 μ M de SB puis trois jours en présence de TNF α . Les extraits nucléaires et cytoplasmiques ont été utilisés pour l'immunoprécipitation de GATA-1 afin de vérifier sa co-immunoprécipitation avec PU.1. Le résultat révèle que l'addition du SB (E/T/S) empêche l'interaction entre PU.1 et GATA-1 (Figure 41A). Nous avons confirmé par Western Blot que la diminution de PU.1 observée dans l'expérience de l'immunoprécipitation n'est pas due à la diminution de son expression (Figure 41B). Ces résultats indiquent que la p38 activée permet la formation du complexe GATA-1/PU.1. Le TNF α pourrait ainsi inhiber l'activité transcriptionnelle de GATA-1 en induisant son interaction avec PU.1 *via* l'activation de la p38MAPK. De plus, il a été décrit que la p38 induit la phosphorylation de PU.1 (Wang *et al.* 2003), de sorte que nos résultats suggèrent que cette phosphorylation pourrait être impliquée dans l'interaction avec GATA-1.

A.



B.

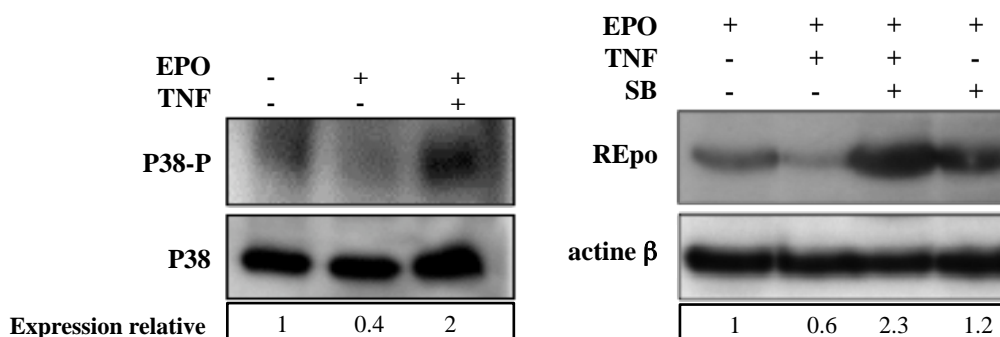


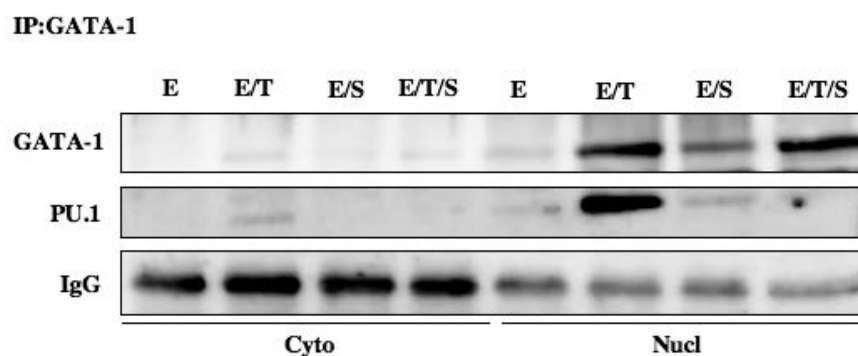
Figure 40: Implication de p38MAPK

A. Test de Benzidine sur des CSH prétraitées ou non avec 20 ng/mL de TNF α et stimulées pendant trois jours avec 2 U/mL d'Epo (E et E/T). L'inhibiteur SB203580 (S) à 10 μ M est ajouté 1h avant le TNF α (E/S/T). L'expérience a été réalisée trois fois.

B. (Gauche) Analyse de l'expression de p38 et p38 phosphorylée (P38-P) par western blot réalisé à partir d'extraits de protéines totales. Les CSH ont été traitées à J0 pendant 1,5 h avec 20 ng/mL de TNF α . L'Epo a été ajoutée 1h après le traitement au TNF α . L'anticorps anti-p38 est utilisé comme contrôle de dépôt.

(Droite) Analyse de l'expression du récepteur à l'Epo (REpo) par western blot à partir d'extraits de protéines totales de CSH prétraitées ou non avec 20 ng/mL de TNF α . Les cellules ont été prétraitées avec 10 μ M de SB203580 (SB) une heure avant le TNF α . Les extraits ont été réalisés après trois jours de traitement. L'actine β est utilisée comme contrôle interne. Un résultat représentatif sur trois expériences indépendantes est montré.

A.



B.

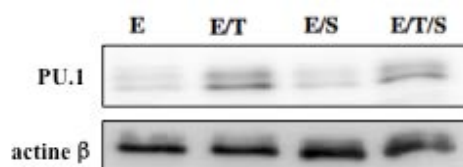


Figure 41 : p38MAPK contribue à la formation du complexe GATA-1/PU.1 induit par le TNF α

A. L'immunoprécipitation de GATA-1 a été réalisée avec 200 μ g de protéines d'extrait nucléaires et cytoplasmiques après trois jours de traitement afin de vérifier sa co-immunoprécipitation avec PU.1. Les cellules ont été traitées pendant une heure avant l'ajout du TNF α , avec 10 μ M d'inhibiteur spécifique de la MAPKp38, SB203580 (S). L'immunoprécipitation est suivie d'un western blot utilisant des anticorps dirigés contre PU.1 et GATA-1. L'anticorps anti-IgG de chèvre est utilisé comme contrôle. Expérience réalisée deux fois.

B. Westren blot réalisé à partir des extraits nucléaires utilisés pour l'immunoprécipitation protéique.

La p38MAPK est rapidement activée par le TNF α dans les CSH et est impliquée dans l'inhibition de l'érythropoïèse. L'utilisation de son inhibiteur spécifique SB203580 permet de confirmer son rôle dans l'effet du TNF α puisqu'il augmente le pourcentage des cellules capables de produire de l'hémoglobine ainsi que l'expression du REpo qui sont diminués sous l'action du TNF α . De plus, il semblerait que l'activation de la p38MAPK soit impliquée dans l'interaction de PU.1 avec GATA-1 en accord avec l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de GATA-1 et de l'érythropoïèse en générale.

4.6 Effet du TNF α sur les miR régulant la balance GATA-1/GATA-2

Le réseau des miRs qui contrôle l'expression de gènes impliqués dans l'hématopoïèse joue un rôle important. Dans un premier temps, nous avons décidé de vérifier la variation de miR qui sont impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse. Nous avons ainsi étudié l'expression des miRs qui composent le cluster miR144-451. L'expression de ces miRs est régulée par GATA-1 et ils ont pour cible l'ARNm de GATA-2, conduisant à une diminution de l'expression du facteur de transcription. Nous avons utilisé la lignée TF1 dans laquelle l'inhibition de la production d'hémoglobine et des gènes érythroïde-spécifiques est corrélée à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de GATA-1 par le TNF α (Buck *et al.* 2009). Les cellules ont été traitées pendant une heure au TNF α et stimulées pendant 6 et 24 h à l'Epo. Les résultats montrent que l'expression des deux miR 144 et 451 diminue de manière significative après traitement au TNF α (Figure 42). Ceci est en corrélation avec l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de GATA-1 mais aussi avec l'augmentation de GATA-2 après traitement. De ce fait, le TNF α pourrait provoquer un déséquilibre de la balance GATA-1/GATA-2 qui est importante pour le bon déroulement de l'érythropoïèse. Nous continuerons d'analyser l'influence du TNF α sur d'autres miR impliqués dans l'érythropoïèse dans des CSH (CD34+ et CD36+) et dans des lignées érythroleucémiques, en présence d'Epo.

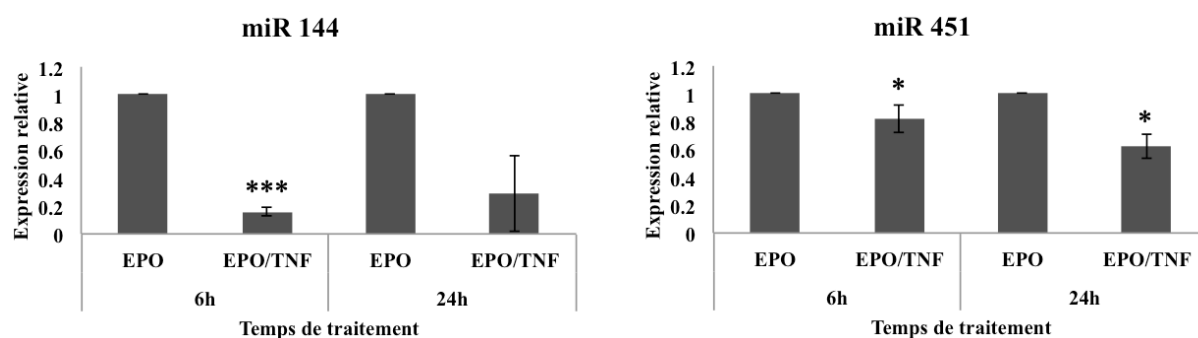


Figure 42 : Effet du TNF α sur l'expression des miR 144-451

Les cellules TF1 ont été traitées pendant une heure au TNF α et stimulées pendant 6h et 24h avec l'Epo. Les ARNm totaux ont été extraits et analysés par PCR en temps réel pour l'expression des miR 144 et 451. Les résultats ont été normalisés par rapport aux gènes de ménage RNU1A et RNU6B et calculés par la méthode du $\Delta\Delta C_T$. L'expérience a été réalisée trois fois. Les données des histogrammes représentent la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Test de Student : *P<0,05 et ***P<0,001.

La balance GATA-1/GATA-2 est perturbée au cours du temps dans les cellules TF1 traitées au TNF α . GATA-1 active l'expression des miR 144 et 451 qui eux mêmes ciblent l'ARNm de GATA-2. L'expression des miR 144 et 451 diminue après traitement au TNF α et est en accord avec l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de GATA-1. De plus ce résultat est corrélé avec l'augmentation de l'expression de GATA-2.

5 DISCUSSION

Le TNF α est généralement décrit comme un inhibiteur de la production de l'Epo au niveau des reins dans le cas des anémies liées aux cancers ou aux maladies inflammatoires chroniques. L'anémie est un symptôme récurrent chez ces patients (Mercadante *et al.* 2000) et il est de plus en plus évident que le TNF α joue un rôle important dans ce phénomène (Buck *et al.* 2009). L'anémie provoque une altération de la qualité de vie des patients et diminue leur pronostic vital (Caro *et al.* 2001). De plus, la cytokine pro-inflammatoire TNF α est retrouvée dans le microenvironnement inflammatoire tumoral et a un effet inhibiteur sur l'érythropoïèse (Johnson *et al.* 1989; Dai *et al.* 1998; Balkwill *et al.* 2001; Papadaki *et al.* 2002; Xiao *et al.* 2002; Balkwill 2004; Morceau *et al.* 2006; Buck *et al.* 2008; Buck *et al.* 2009).

La RhEpo utilisée actuellement pour corriger le taux d'hémoglobine est efficace, mais le traitement est suspecté de provoquer une progression des tumeurs chez les patients cancéreux (Littlewood *et al.* 2001; Leyland-Jones *et al.* 2005) et des thromboembolismes veineux (Bennett *et al.* 2008; Samaras *et al.* 2008). Le traitement anti-TNF α pourrait quant à lui, augmenter le risque de cancer et d'infection chez les patients atteints des maladies inflammatoires chroniques (Scheinfeld 2004; Yan *et al.* 2006). D'autre part, chez certains patients anémiques la production d'Epo n'est pas inhibée, de sorte qu'un traitement à la RhEpo n'a pas d'effet sur l'anémie. Ainsi, il semble important de mieux connaître les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement d'anémie induite par les cytokines pro-inflammatoires. Nous nous sommes intéressés aux mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'inhibition de l'érythropoïèse par le TNF α . Nous avons choisi d'utiliser des cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34+ comme modèle. L'ensemble des CSH a été stimulé par l'Epo afin d'induire l'érythropoïèse *in vitro* et l'effet du TNF α a été étudié spécifiquement sur cette voie de différenciation, tout en observant son effet potentiel sur les autres branches de l'hématopoïèse.

5.1 Choix du modèle

Les cellules portant le marqueur CD34 sont des CSH, ainsi que des progéniteurs précocement retrouvés dans la voie de différenciation de l'érythropoïèse. Ce marqueur est retrouvé dans une large partie de la population des progéniteurs hématopoïétiques. Les CSH sont des cellules multipotentes qui peuvent s'engager, sous l'action de différentes cytokines, vers toutes les voies de différenciation et donner ainsi les différentes cellules sanguines. Les

CSH peuvent être trouvées dans la moelle osseuse, dans le sang circulant et dans le sang de cordon ombilical. En prenant en considération que le prélèvement de la moelle osseuse est douloureux et que l'intervention est relativement lourde, la meilleure source de CSH pour des études *in vitro*, est donc le sang. Le sang circulant est pauvre en CSH alors que le sang de cordon ombilical en est riche. Nous avons choisi d'utiliser comme source de CSH CD34+, le sang de cordon ombilical. Les cellules CD34+ ont été isolées et mises en culture dans du milieu dépourvu de sérum. Ce milieu est additionné d'un cocktail de cytokine et de facteur de croissance comme l'IL3 et le SCF qui permettent aux cellules de survivre et de proliférer. Nous avons validé ce système *in vitro* pour l'étude de l'impact du TNF α sur l'érythropoïèse puisque nous avons d'une part reproduit les différents stades de la différenciation érythroïde après stimulation des cellules par l'Epo et d'autre part nous avons vérifié la capacité des CSH en culture à répondre au TNF α par l'évaluation de l'activation du facteur de transcription NF- κ B.

En effet, le TNF α *via* des récepteurs membranaires (TNFRI et II), est capable de stimuler la voie de signalisation conduisant à l'activation du facteur NF- κ B (Aggarwal 2003). Le TNF α induit fortement le dimère formé par les sous-unités p50 et RelA/p65 de NF- κ B. Ce dimère séquestré dans le cytoplasme par son inhibiteur I κ B α (Inhibitor of NF- κ B) est libéré et transloqué dans le noyau de la cellule sous l'effet du TNF α . Nous avons donc analysé la capacité de la cytokine à induire l'activation de ce facteur dans les CSH en vérifiant sa présence dans les extraits nucléaires par retard de migration sur gel. L'augmentation de ce facteur dans le noyau indique que les cellules sont sensibles au traitement par le TNF α , validant ainsi le modèle. De plus, ceci suggère que le TNF α peut agir directement sur les CSH et conduire à des modifications, notamment de leur état de différenciation. En effet, le facteur NF- κ B a déjà été décrit comme un régulateur potentiellement négatif de l'expression des gènes de globines (Liu *et al.* 2003). Il est important de noter que dans nos conditions expérimentales, l'Epo n'induit pas l'activation du facteur NF- κ B, ce qui est en accord avec la littérature.

Nous avons choisi dans un premier temps de travailler sur l'ensemble des cellules CD34+ isolées sans sélectionner les progéniteurs érythroïdes afin d'observer l'effet du TNF α dans des conditions les plus proches possibles de la réalité physiologique. De plus, ce choix a été motivé par l'hypothèse que le TNF α agirait sur les CSH avant tout engagement dans une voie de différenciation.

Cependant, ce modèle expérimental représente une simplification de la situation *in vivo* puisqu'elle ne tient pas compte des autres cytokines et facteurs de croissance impliqués dans

l'hématopoïèse, ni des médiateurs de l'inflammation qui peuvent être impliqués dans le développement de l'anémie comme l'interféron- γ (Libregts *et al.* 2011).

Le taux de pureté en cellules CD34+ dans la culture cellulaire à J-3 est de 95%. Les doubles marquages CD34+/CD38+ et CD117+/CD38+ montrent une perte du marqueur CD38 au cours des trois jours en culture avant traitement. Ceci est attendu puisque l'expression du marqueur CD38 disparaît dans des cultures de courte durée alors que les cellules restent capables de proliférer et de se différencier (von Laer *et al.* 2000). Afin de valider notre système nous avons vérifié que les cellules avaient conservé un statut de cellule non différenciées pendant les trois premiers jours de culture. La présence de différents marqueurs spécifiques précoces ou tardifs (CD10, CD11b, CD14, CD15, CD24, CD36, CD41, CD235/GPA) de différentes voies hématopoïétiques a été observée à J0. Le milieu permet donc le maintien du statut de CSH jusqu'à J0, jour du début de la stimulation par l'Epo. Ceci indique que l'IL3 et le SCF n'ont pas d'activité inductrice de différenciation dans notre système. L'absence de ces marqueurs dans la population cellulaire nous a également permis de valider notre modèle expérimental *in vitro* pour étudier l'effet du TNF α sur l'érythropoïèse. L'utilisation de l'Epo et du cocktail de cytokine selon un protocole emprunté à Carlile *et al.*, a permis de reproduire l'érythropoïèse *in vitro* et les différents stades morphologiques et phénotypiques qui la caractérisent (Carlile *et al.* 2004). Dans notre étude, la progression des cellules dans la voie de différenciation érythroïde est en phase avec celle de ces auteurs puisqu'ils observent, comme dans notre cas, les premières énucléations entre le 10^{ème} et le 13^{ème} jour de culture. Le jour J8 dans notre nomenclature correspond en effet au 12^{ème} jour de culture. Leurs analyses des marqueurs spécifiques de cellules érythroïdes comme le CD36 et la GPA ont montré que toutes les cellules correspondaient à des érythroblastes au 15^{ème} jour de culture, dont 30% en cours d'énucléation. La capacité des CSH à se différencier jusqu'au stade terminal dans ce milieu différenciant démontre que ce système de culture représente un modèle valide de l'érythropoïèse.

5.2 TNF α et différenciation

L'effet inhibiteur du TNF α sur l'érythropoïèse induite par l'Epo dans notre système a été observé au niveau cellulaire dans un premier temps par la diminution du taux de cellules hémoglobinisées (benzidine positives), l'absence de cellules érythroïdes matures (coloration MGG) et la diminution des marqueurs CD36 et GPA qui sont spécifiques des cellules érythroïdes. Ces observations ont pu être corrélées au niveau moléculaire à l'inhibition de

l'expression des gènes tels que le récepteur à l'Epo (REpo) et les globines. Le REpo par son interaction avec l'Epo, est en effet indispensable au déclenchement et au développement de l'érythropoïèse en jouant un rôle dans la régulation de l'expression du facteur GATA-1 (Chiba *et al.* 1991), dans le maintien de la prolifération et de la survie des cellules. Les gènes de globines sont spécifiquement exprimés dans les cellules érythroïdes, et entrent dans la composition du principal marqueur phénotypique de différenciation érythroïde, l'hémoglobine. La cohérence entre ces différents résultats a donc permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur du TNF α sur la différenciation érythroïde des CSH CD34+ stimulées à l'Epo. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans les lignées érythroleucémiques comme les K562, les HEL et les TF1 (Morceau *et al.* 2006; Buck *et al.* 2008; Buck *et al.* 2009).

Tous les gènes qui sont spécifiquement exprimés dans les cellules érythroïdes ainsi que de nombreux gènes impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse comme des facteurs de transcription (Tal1, GATA-1, GATA-2, EKLF, NFE2...) sont régulés par le facteur GATA-1. Il était donc important de vérifier l'effet du TNF α sur l'expression et l'activité de ce facteur dans notre modèle. Les études préalables menées au laboratoire sur les lignées cellulaires établies, avaient pointé le rôle de GATA-1 dans l'effet inhibiteur du TNF α avec une diminution de son expression, notamment dans les cellules TF1 induites à se différencier par l'Epo (Buck *et al.* 2008).

Au plan moléculaire, le traitement des CSH par le TNF α induit une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine GATA-1 après 4 jours de traitement dans le milieu de culture principalement utilisé (milieu 1). Dans le milieu 2, l'expression de GATA-1 n'est pas significativement affectée par le TNF α . Ces résultats semblent être en contradiction avec une inhibition de l'érythropoïèse compte tenu du rôle prépondérant de GATA-1 dans les premiers jours de l'érythropoïèse. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet du TNF α sur l'activité transcriptionnelle de GATA-1. Les cellules TF1 expriment très faiblement la protéine GATA-1 lorsqu'elles sont cultivées en présence de GM-CSF. L'expression d'une protéine exogène obtenue par transfection transitoire d'un vecteur d'expression (pXM-GATA1) nous a permis de montrer que le TNF α inhibe l'activité transcriptionnelle de GATA-1 indépendamment de son niveau d'expression.

L'activité de GATA-1 est connue pour être régulée au niveau post-traductionnel, notamment par le facteur PU.1. En effet, PU.1 est décrit comme un régulateur transcriptionnel de la myélopoïèse (Tenen *et al.* 1997). Dans la lignée érythroïde l'activité de PU.1 est réprimée par GATA-1 qui entre en compétition avec le cofacteur de PU.1, c-Jun, ce qui est essentiel pour

un développement normal de l'érythropoïèse (Nerlov *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2000; Chou *et al.* 2009). Au contraire, un haut niveau d'expression de PU.1 est connu pour réprimer l'activité de GATA-1 et donc la différenciation érythroïde (Yamada *et al.* 1998; Rekhtman *et al.* 1999; Nerlov *et al.* 2000). Ainsi, l'inhibition réciproque des deux facteurs permet un équilibre crucial entre l'engagement des cellules souches vers la différenciation érythroïde et la différenciation myéloïde. Dans notre modèle, l'expression du facteur PU.1 est fortement augmentée aux niveaux de l'ARNm et de la protéine en présence de TNF α . Ces résultats ont été reproduits pour l'expression de la protéine dans les deux milieux différents de culture sans sérum, de prolifération et de différenciation. Le fait que l'expression de GATA-1, au contraire varie entre ces deux milieux, suggère fortement que le niveau d'expression de ce facteur n'est pas en cause dans l'effet inhibiteur du TNF α . En revanche, l'augmentation de PU.1 dans les deux milieux nous a conduit à penser que ce facteur est impliqué dans l'inhibition de l'érythropoïèse induite par le TNF α en réduisant l'activité de GATA-1. Récemment, Libregts *et al.*, ont montré le rôle d'une autre cytokine pro-inflammatoire, l'interféron- γ , dans l'inhibition de l'érythropoïèse et le développement d'anémie chez la souris. Leurs résultats montrent également que l'expression du facteur GATA-1 n'est pas modifiée mais que l'interféron induit une surexpression du facteur PU.1, expliquant en partie l'effet inhibiteur de la cytokine sur l'érythropoïèse (Libregts *et al.* 2011). Dans les CSH différenciées par l'Epo et traitées par le TNF α , nous avons observé une augmentation de la formation du complexe GATA-1/PU.1 en corrélation avec l'inhibition de la différenciation érythroïde.

Par ailleurs, nous avons pu observer l'activation rapide de la p38MAPK après le traitement des cellules CD34+ au TNF α . La p38MAPK est une sérine-thréonine kinase importante dans l'érythropoïèse (Wei *et al.* 2007; Scicchitano *et al.* 2008). En utilisant l'inhibiteur spécifique de la p38MAPK, SB203580, nous avons confirmé le rôle de la phosphorylation de la p38MAPK dans l'effet inhibiteur du TNF α sur l'érythropoïèse. Ceci avait été également proposé par Buck *et al.* dans la lignée TF1 (Buck *et al.* 2008). De plus, l'implication de p38MAPK comme médiateur de l'effet inhibiteur de l'IFN γ et du TNF α *in vitro* sur des cellules CD34+ a été également proposée par Verma *et al.* (Verma *et al.* 2002). Ainsi, ayant constaté que le TNF α inhibait l'érythropoïèse en corrélation avec la phosphorylation de p38 et l'augmentation de l'interaction GATA-1/PU.1, nous avons pensé que les deux événements pouvaient être liés. En effet, la protéine PU.1 peut être activée par phosphorylation de la sérine 142 par la p38MAPK (Wang *et al.* 2003). Nous avons montré par immunoprécipitation protéique que l'interaction de PU.1 avec GATA-1 est rompue en présence de l'inhibiteur de p38MAPK. Ceci démontre que l'activation de la p38MAPK par le TNF α dans

les CSH pourrait être un élément clé dans la capacité du TNF α à inhiber l'érythropoïèse, notamment en favorisant la formation du complexe GATA-1/PU.1. Toutefois, le mécanisme conduisant à la disparition du complexe GATA-1/PU.1 en présence du SB203580 n'est pas connu. La phosphorylation de PU.1 par la p38MAPK est décrite comme activatrice de sa fonction de facteur de transcription mais à notre connaissance, aucune étude n'a démontré un rôle de cette phosphorylation dans la liaison de PU.1 avec d'autres protéines.

En parallèle, nous avons observé par les colorations MGG et la cytométrie en flux la présence de cellules monocytaires et granulocytaires. Nous supposons que le TNF α dirigerait les CSH CD34+ vers la différenciation granulo-monocytaire tout en inhibant la voie érythrocytaire. En effet, nous avons testé plusieurs marqueurs spécifiques pour chacune des voies de différenciation de l'hématopoïèse. La présence de cellules portant le marqueur CD38 est plus importante dans la population traitée au TNF α . Ce marqueur est caractéristique des basophiles, des monocytes, des progéniteurs hématopoïétiques, des lymphocytes T (LT) actifs et LB (<http://pathologyoutlines.com/cdmarkers.html>). De plus, PU.1 jouant aussi un rôle dans les autres voies de l'hématopoïèse, il pourrait en collaboration avec d'autres cofacteurs comme C/EBP α , Ikaros, GATA-3 et Lmo2 stimuler d'autres voies de différenciation tout en inhibant celle de l'érythropoïèse (Figure 5). En effet, l'augmentation de l'expression de PU.1 est en accord avec l'augmentation du phénotype granulo-monocytaire observé dans notre système après traitement au TNF α .

D'autre part, nous avons pu constater que l'effet inhibiteur du TNF α sur le développement des cellules érythroïdes n'était que partiel puisque des cellules hémoglobinisées ou qui expriment la GPA sont encore présentes après neuf jours de traitement au TNF α . Cependant, les résultats de cytométrie en flux exprimés en MFI suggèrent que le taux d'expression de la GPA dans les cellules est diminué de 60% après les neuf jours de traitement. L'expression des globines dans les cellules GPA+ isolées après neuf jours de traitement va également dans le sens d'une diminution. Dans ces cellules, le facteur PU.1 est maintenu à un niveau d'expression plus élevé que dans les cellules cultivées en présence d'Epo seule, en accord avec une réduction de l'expression des gènes érythroïdes cibles de GATA-1. Il semble donc que des marqueurs phénotypiques érythroïdes soient détectables dans des cellules traitées au TNF α mais que l'expression des gènes soit néanmoins réduite dans ces cellules.

Afin de pouvoir affirmer que l'inhibition de l'érythropoïèse est due à un effet direct du TNF α sur la lignée érythroïde, nous avons étudié l'effet de la cytokine au niveau moléculaire sur des cellules érythroïdes en culture. Ainsi, il était intéressant d'étudier l'effet du TNF α sur une population isolée de cellules GPA+ car ces cellules sont déjà engagées dans la voie de

différenciation érythroïde. La très nette augmentation de PU.1 et de GATA-2 après quatre jours de traitement montre que le TNF α agit de manière directe sur les cellules érythroïdes en modulant les facteurs de transcription. Au contraire, l'expression des globines reste invariable après traitement des cellules déjà engagées dans la différenciation érythroïde, ce qui est en accord avec la grande stabilité des ARNm de globine (Ji *et al.* 2007). Ceci suggère que le spectre d'action du TNF α est assez large puisque outre les CSH il peut atteindre des cellules à un stade plus tardif de l'érythropoïèse.

Le bon déroulement de l'hématopoïèse nécessite un équilibre finement régulé entre les facteurs GATA-1 et GATA-2. Cet équilibre peut être contrôlé par différentes voies. En particulier, GATA-2 est surexprimé en absence de GATA-1 (Weiss *et al.* 1994) et des études approfondies sur la régulation des gènes cibles de GATA-1 ont révélé que le gène de GATA-2 était réprimé par GATA-1 (Shirihai *et al.* 2000; Rylski *et al.* 2003). Weiss *et al.* ont démontré que le niveau d'expression de l'ARNm de GATA-2 était considérablement augmenté dans les progéniteurs érythroïdes déficients en GATA-1 (Weiss *et al.* 1995). La description du mécanisme démontre que la transcription du gène de GATA-2 est régulée par GATA-2 lui-même en association avec le facteur CBP, favorisant l'acétylation du gène. Une surexpression de GATA-1 déplace le complexe GATA-2/CBP de son site sur le promoteur de GATA-2, ce qui entraîne une repression de la transcription du gène de GATA-2 (Ferreira *et al.* 2005; Ferreira *et al.* 2007). Nous avons montré que l'expression de l'ARNm de GATA-2 est trois fois plus importante que celle de GATA-1 dans les CSH cultivées en milieu différenciant en présence de TNF α . Nos résultats montrent également une augmentation de l'expression de GATA-2, qui pourrait donc résulter de l'inhibition de l'activité de GATA-1 dans notre système. Dans une étude de La Ferla *et al.* il a été démontré que le TNF α pouvait induire l'expression du facteur GATA-2 dans les cellules d'hépatocarcinome HepG2 (La Ferla *et al.* 2002). Comme pour le facteur PU.1, l'expression de la protéine GATA-2 est augmentée dans les deux milieux de culture, ce qui suggère également une implication de GATA-2 dans l'effet inhibiteur du TNF α sur l'érythropoïèse. En effet, il est bien établi que la surexpression du facteur GATA-2 induit l'inhibition de l'érythropoïèse et l'activation de la mégacaryopoïèse (Briegel *et al.* 1993; Ikonomi *et al.* 2000) en absence de GATA-1 (Kulesa *et al.* 1995; Huang *et al.* 2009). Sachant que dans l'érythropoïèse, l'expression de GATA-1 évolue au cours du processus de maturation avec un pic au stade CFU/proérythroblaste (Ferreira *et al.* 2005; Ferreira *et al.* 2007), et que par ailleurs, GATA-2 est seulement surexprimé aux stades plus précoces pour assurer la prolifération cellulaire, il semble évident que le TNF α agit sur la balance GATA-1/GATA-2 pour perturber la différenciation érythroïde.

D'autre part, cet équilibre peut être régulé par l'expression de miRNA spécifiques. Nous avons démontré dans la lignée TF1, que l'expression des miR 144 et 451 qui est régulée par GATA-1 (Dore *et al.* 2008) est inhibée sous l'action du TNF α . Ces résultats sont en accord avec l'augmentation de l'expression de GATA-2 puisque ces miR ciblent l'ARNm de ce facteur en le déstabilisant (Pase *et al.* 2009). Par conséquent, le réseau des miR impliqués dans le maintien de l'équilibre entre GATA-1 et GATA-2 est perturbé par le TNF α et peut donc s'ajouter à d'autres effets induits par la cytokine sur l'érythropoïèse. Il sera intéressant d'approfondir le rôle du TNF α sur le réseau des miR impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse.

Compte tenu du rôle des deux facteurs de transcription GATA-2 et PU.1 dans la régulation négative de l'érythropoïèse, ces résultats nous ont suggéré que l'effet inhibiteur du TNF α était probablement associé à leur surexpression. De manière évidente, cette hypothèse implique le facteur GATA-1 dont la répression de l'activité entraîne une réduction de l'expression des gènes spécifiques de la voie érythroïde.

5.3 TNF α , prolifération et survie des CSH

Il est clairement établi que la capacité des cellules à proliférer diminue à mesure qu'elles progressent vers le stade terminal de différenciation. Dans notre système nous observons une augmentation de la prolifération des cellules CD34+ stimulées à l'Epo lorsqu'elles sont traitées au TNF α . En même temps, dans ces conditions de culture, nous avons constaté la présence de nombreuses cellules érythroblastiques immatures après plusieurs jours de culture. L'augmentation de la prolifération des progéniteurs érythroïdes immatures ainsi que des progéniteurs hématopoïétiques est fortement maintenue en corrélation avec la surexpression du facteur GATA-2 (Tsai *et al.* 1997) mais aussi de STAT5 (Matsumura *et al.* 1999; Socolovsky *et al.* 2001). Nous avons mis ceci en évidence dans notre modèle de culture de CSH. L'activation constitutive de STAT5 conduit à l'augmentation de l'auto-renouvellement et de la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques (Schuringa *et al.* 2004; Wierenga *et al.* 2008). De plus, la voie JAK2/STAT5 est déjà connue comme étant impliquée dans l'érythropoïèse puisque les souris STAT5^{-/-} sont déficientes en érythroblastes et leur survie est diminuée (Socolovsky *et al.* 2001). STAT5 régule l'expression de Bcl-xL, une protéine anti-apoptotique et la Cycline D1 une protéine jouant un rôle dans la prolifération cellulaire, toutes les deux importantes pour la survie et l'auto-renouvellement des progéniteurs érythroïdes (Testa 2004).

Les résultats obtenus par gel-retard confirment l'implication de STAT5 dans l'inhibition de l'érythropoïèse par le TNF α dans notre système *in vitro*. La phosphorylation rapide de

STAT5 est également augmentée suite au traitement au TNF α . Cette phosphorylation induit à son activation, qui se traduit par sa dimérisation, sa translocation nucléaire et son activité transcriptionnelle envers ses gènes cibles. Nous avons confirmé que la tyrosine kinase JAK2, l'acteur principal en amont de STAT5, est activé puisque sa phosphorylation augmente sous l'effet du TNF α . De plus, l'expression protéique du gène cible de STAT5, la Cycline D1 est augmentée suite au traitement avec le TNF α . Au contraire, les résultats ont montré que l'expression de Bcl-xL reste invariable. Il a récemment été démontré par Wierenga *et al.* que les cellules CD34+ ayant une activité constitutive de STAT5 et une expression reprimée de GATA-1, présentent une augmentation de leur prolifération (Wierenga *et al.* 2010).

Se basant sur les résultats qui indiquent une augmentation de PU.1, nous avons vérifié l'expression de son gène cible aux effets anti-apoptotiques, Mcl-1. Nous avons pu démontrer que l'expression protéique de Mcl-1 augmente avec le traitement au TNF α dans notre système. Ces résultats vont dans le sens d'une augmentation de la prolifération des CSH et de leur survie en présence du TNF α . De plus, il a été récemment montré que PU.1 favorise la prolifération des cellules érythroïdes tout en inhibant leur différenciation *via* l'activation de la CDK6 qui en association avec la Cycline D1 jouent un rôle important dans le déroulement de la phase G1 du cycle cellulaire (Choe *et al.* 2010).

Nous avons voulu par la suite étudier plus en détail les acteurs impliqués dans la prolifération et la progression du cycle cellulaire. Dans ce but nous avons vérifié l'expression de c-Myc dont le niveau d'expression peut déterminer l'orientation des cellules vers la prolifération ou la différenciation érythroïde terminale. Plus précisément, la diminution de c-Myc dans les phases tardives de la différenciation érythroïde est corrélée avec la désacétylation globale des histones, processus indispensable à la condensation nucléaire dans les érythrocytes et l'énucléation (Jayapal *et al.* 2010). C-Myc est un proto-oncogène régulé négativement par GATA-1 et il exerce un rétrocontrôle négatif dans les cellules en cours de différenciation en jouant ainsi un rôle dans la balance entre les processus de différenciation érythroïde et mégacaryocytaire (Guo *et al.* 2009). Nos résultats ont montré une augmentation de son expression en présence de TNF α . La protéine c-Myc contrôle négativement l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27 à la fin du processus de différenciation (Obaya *et al.* 2002; Acosta *et al.* 2008). Dans notre modèle l'expression de p27 diminue et ceci est en corrélation avec l'augmentation de c-Myc et la prolifération des cellules sous l'effet du TNF α .

6 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos résultats ont révélé un effet du TNF α sur les progéniteurs hématopoïétiques (cellules CD34+) ainsi que sur les cellules érythroïdes (cellules GPA+) en présence d'une concentration d'Epo différenciante. Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence l'effet direct du TNF α sur les progéniteurs hématopoïétiques. Par ailleurs, Tsopra *et al.* ont récemment étudié le taux de TNF α chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (LLC), anémiques ou non. Leurs résultats confirment l'effet direct du TNF α sur les progéniteurs érythroïdes (Tsopra *et al.* 2009).

En prenant en considération nos résultats, nous pouvons suggérer que le TNF α agirait sur plusieurs acteurs différents, impliqués dans l'érythropoïèse. Son action peut être inhibitrice, comme nous l'avons montré sur l'activité transcriptionnelle de GATA-1, ou activatrice en surexprimant GATA-2. Elle peut également être directement ou indirectement liée à GATA-1 par la surexpression de son inhibiteur PU.1, ou par celle de GATA-2. Le fait est que le TNF α entraîne un déséquilibre dans la subtile régulation de la balance GATA-1/GATA-2, qui est un élément crucial pour le développement normal des progéniteurs érythro/mégacaryocytaires. Nos résultats proposent que la p38MAPK est impliquée dans ce déséquilibre. Les mécanismes de prolifération et de mort cellulaire qui sont étroitement liés à la progression des cellules dans les différents stades de différenciation sont également affectés. Notamment, la voie JAK2/STAT5 semble être précocement suractivée dans les CSH par le TNF α . L'ensemble des événements cellulaires et moléculaires rapportés ont été observés dans des conditions de culture différenciantes en présence d'Epo. Ceci implique que le TNF α agit globalement en inhibant d'abord l'activité de l'Epo et de son récepteur REpo. Il en résulte dans ce cas précis, qu'un traitement de patient anémique avec une forme de RhEpo serait probablement sans effet. En effet, une étude effectuée sur 35 patients cancéreux anémiques a démontré que des niveaux sériques élevés de TNF α et d'IL6 sont significativement corrélés avec une faible réponse au traitement RhEpo. De plus, les autres paramètres évalués ne diffèrent pas (niveau d'Hb, analyse sanguine). Il en résulte que l'évaluation de ces deux paramètres avant traitement peut être utilisée comme outil de prédiction à la réponse au traitement au RhEpo (Pavese *et al.* 2010).

En conclusion, le TNF α perturbe l'agencement harmonieusement orchestré des médiateurs de l'hématopoïèse, favorisant le désordre et conduisant à une érythropoïèse incomplète qui se traduit par l'apparition d'anémie.

Perspectives

- Nous avons démontré l'implication de la p38MAPK dans l'effet inhibiteur du TNF α sur l'érythropoïèse. Nous poursuivons ce projet par l'étude de l'effet du TNF α sur l'acétylation de GATA-1, GATA-2 et de la sous-unité p65 de NF- κ B. L'acétylation de ces facteurs de transcription est en effet nécessaire à leur activité transcriptionnelle et est dépendante de l'activation de l'histone acétyl transférase p300 qui est elle même activée par la p38MAPK.
- Nous nous intéresserons aux autres voies de signalisation cellulaires stimulées par l'interaction Epo/REpo telle que la voie PI3K/AKT et la voie des caspases.
- Nous étudierons l'effet du TNF α sur des miRNA impliqués dans l'érythropoïèse en relation ou non avec GATA-1. Ces expériences seront menées préférentiellement dans des progéniteurs érythroïdes sélectionnés positivement pour le marqueur érythro-spécifique CD36.

BIBLIOGRAPHIE

A

ACOSTA J.C., FERRANDIZ N., BRETONES G., TORRANO V., BLANCO R., RICHARD C., O'CONNELL B., SEDIVY J., DELGADO M.D. and LEON J. Myc inhibits p27-induced erythroid differentiation of leukemia cells by repressing erythroid master genes without reversing p27-mediated cell cycle arrest. *Molecular and cellular biology*, 2008, 28(24): 7286-7295.

AGARWAL N., GORDEUK V.R. and PRCHAL J.T. Are erythropoietin receptors expressed in tumors? Facts and fiction--more careful studies are needed. *J Clin Oncol*, 2007, 25(13): 1813-1814; author reply 1815.

AGGARWAL B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(9): 745-756.

AGGARWAL B.B. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell*, 2004, 6(3): 203-208.

AMBROS V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004, 431(7006): 350-355.

ANDERSON M.K., WEISS A.H., HERNANDEZ-HOYOS G., DIONNE C.J. and ROTHENBERG E.V. Constitutive expression of PU.1 in fetal hematopoietic progenitors blocks T cell development at the pro-T cell stage. *Immunity*, 2002, 16(2): 285-296.

ANGUITA E., HUGHES J., HEYWORTH C., BLOBEL G.A., WOOD W.G. and HIGGS D.R. Globin gene activation during haemopoiesis is driven by protein complexes nucleated by GATA-1 and GATA-2. *The EMBO journal*, 2004, 23(14): 2841-2852.

ARNOTT C.H., SCOTT K.A., MOORE R.J., ROBINSON S.C., THOMPSON R.G. and BALKWILL F.R. Expression of both TNF-alpha receptor subtypes is essential for optimal skin tumour development. *Oncogene*, 2004, 23(10): 1902-1910.

B

BALDUINI C.L., PECCI A., LOFFREDO G., IZZO P., NORIS P., GROSSO M., BERGAMASCHI G., ROSTI V., MAGRINI U., CERESA I.F., CONTI V., POGGI V. and SAVOIA A. Effects of the R216Q mutation of GATA-1 on erythropoiesis and megakaryocytopoiesis. *Thromb Haemost*, 2004, 91(1): 129-140.

BALKWILL F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002, 13(2): 135-141.

BALKWILL F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(7): 540-550.

BALKWILL F. and MANTOVANI A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 2001, 357(9255): 539-545.

BEAUMONT C. and CANONNE-HERGAUX F. [Erythrophagocytosis and recycling of heme iron in normal and pathological conditions; regulation by hepcidin]. *Transfus Clin Biol*, 2005, 12(2): 123-130.

BENNETT C.L., SILVER S.M., DJULBEGOVIC B., SAMARAS A.T., BLAU C.A., GLEASON K.J., BARNATO S.E., ELVERMAN K.M., COURTNEY D.M., MCKOY J.M., EDWARDS B.J., TIGUE C.C., RAISCH D.W., YARNOLD P.R., DORR D.A., KUZEL T.M., TALLMAN M.S., TRIFILIO S.M., WEST D.P., LAI S.Y. and HENKE M. Venous thromboembolism and mortality associated with recombinant erythropoietin and darbepoetin administration for the treatment of cancer-associated anemia. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 2008, 299(8): 914-924.

BERG C.P., ENGELS I.H., ROTHBART A., LAUBER K., RENZ A., SCHLOSSER S.F., SCHULZE-OSTHOFF K. and WESSELBORG S. Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ*, 2001, 8(12): 1197-1206.

BEYNE-RAUZY O., PRADE-HOUDELLIER N., DEMUR C., RECHER C., AYEL J., LAURENT G. and MANSAT-DE MAS V. Tumor necrosis factor-alpha inhibits hTERT gene expression in human myeloid normal and leukemic cells. *Blood*, 2005, 106(9): 3200-3205.

BEYNE-RAUZY O., RECHER C., DASTUGUE N., DEMUR C., POTTIER G., LAURENT G., SABATIER L. and MANSAT-DE MAS V. Tumor necrosis factor alpha induces senescence and chromosomal instability in human leukemic cells. *Oncogene*, 2004, 23(45): 7507-7516.

BINGLE L., BROWN N.J. and LEWIS C.E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol*, 2002, 196(3): 254-265.

BJORNSON C.R., RIETZE R.L., REYNOLDS B.A., MAGLI M.C. and VESCOVI A.L. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*, 1999, 283(5401): 534-537.

BLAU H.M., BRAZELTON T.R. and WEIMANN J.M. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*, 2001, 105(7): 829-841.

BLICK M., SHERWIN S.A., ROSENBLUM M. and GUTTERMAN J. Phase I study of recombinant tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer Res*, 1987, 47(11): 2986-2989.

BLOBEL G.A., NAKAJIMA T., ECKNER R., MONTMINY M. and ORKIN S.H. CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(5): 2061-2066.

BOTTARDI S., ROSS J., BOURGOIN V., FOTOUHI-ARDAKANI N., AFFAR EL B., TRUDEL M. and MILOT E. Ikaros and GATA-1 combinatorial effect is required for silencing of human gamma-globin genes. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(6): 1526-1537.

BOUSCARY D., PENE F., CLAESSENS Y.E., MULLER O., CHRETIEN S., FONTENAY-ROUPIE M., GISSELBRECHT S., MAYEUX P. and LACOMBE C. Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood*, 2003, 101(9): 3436-3443.

BOYES J., BYFIELD P., NAKATANI Y. and OGRYZKO V. Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature*, 1998, 396(6711): 594-598.

BRIEGEL K., LIM K.C., PLANK C., BEUG H., ENGEL J.D. and ZENKE M. Ectopic expression of a conditional GATA-2/estrogen receptor chimera arrests erythroid differentiation in a hormone-dependent manner. *Genes Dev*, 1993, 7(6): 1097-1109.

BROXMEYER H.E. and CAROW C.E. Characterization of cord blood stem/progenitor cells. *J Hematother*, 1993, 2(2): 197-199.

BROXMEYER H.E., COOPER S., HANGOC G. and KIM C.H. Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 selectively counteracts inhibitory effects of myelosuppressive chemokines on hematopoietic progenitor cell proliferation in vitro. *Stem Cells Dev*, 2005, 14(2): 199-203.

BROXMEYER H.E., DOUGLAS G.W., HANGOC G., COOPER S., BARD J., ENGLISH D., ARNY M., THOMAS L. and BOYSE E.A. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(10): 3828-3832.

BUCK I., MORCEAU F., CRISTOFANON S., HEINTZ C., CHATEAUVIEUX S., REUTER S., DICATO M. and DIEDERICH M. Tumor necrosis factor alpha inhibits erythroid differentiation in human erythropoietin-dependent cells involving p38 MAPK pathway, GATA-1 and FOG-1 downregulation and GATA-2 upregulation. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(10): 1229-1239.

BUCK I., MORCEAU F., CRISTOFANON S., REUTER S., DICATO M. and DIEDERICH M. The inhibitory effect of the proinflammatory cytokine TNFalpha on erythroid differentiation involves erythroid transcription factor modulation. *Int J Oncol*, 2009, 34(3): 853-860.

BUCK I., MORCEAU F., GRIGORAKAKI C., DICATO M. and DIEDERICH M. Linking anemia to inflammation and cancer: the crucial role of TNFalpha. *Biochem Pharmacol*, 2009, 77(10): 1572-1579.

BURCH J.B. Regulation of GATA gene expression during vertebrate development. *Semin Cell Dev Biol*, 2005, 16(1): 71-81.

BURDA P., LASLO P. and STOPKA T. The role of PU.1 and GATA-1 transcription factors during normal and leukemogenic hematopoiesis. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 2010, 24(7): 1249-1257.

C

CALLIGARIS R., BOTTARDI S., COGOI S., APEZTEGUIA I. and SANTORO C. Alternative translation initiation site usage results in two functionally distinct forms of the GATA-1 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(25): 11598-11602.

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

CARO J.J., SALAS M., WARD A. and GOSS G. Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: a systemic, quantitative review. *Cancer*, 2001, 91(12): 2214-2221.

CARROLL M.P., SPIVAK J.L., MCMAHON M., WEICH N., RAPP U.R. and MAY W.S. Erythropoietin induces Raf-1 activation and Raf-1 is required for erythropoietin-mediated proliferation. *J Biol Chem*, 1991, 266(23): 14964-14969.

CARSWELL E.A., OLD L.J., KASSEL R.L., GREEN S., FIORE N. and WILLIAMSON B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975, 72(9): 3666-3670.

CASADEVALL N., NATAF J., VIRON B., KOLTA A., KILADJIAN J.J., MARTIN-DUPONT P., MICHAUD P., PAPO T., UGO V., TEYSSANDIER I., VARET B. and MAYEUX P. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *The New England journal of medicine*, 2002, 346(7): 469-475.

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

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

CHATEAUVIEUX S., GRIGORAKAKI C., MORCEAU F., DICATO M. and DIEDERICH M. Erythropoietin, Erythropoiesis and Beyond. *Biochem Pharmacol*, 2011, In press

CHEN C.Z., LI L., LODISH H.F. and BARTEL D.P. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 2004, 303(5654): 83-86.

CHEN Z., LUO H.Y., BASRAN R.K., HSU T.H., MANG D.W., NUNTAKARN L., ROSENFELD C.G., PATRINOS G.P., HARDISON R.C., STEINBERG M.H. and CHUI D.H. A T-to-G transversion at nucleotide -567 upstream of HBG2 in a GATA-1 binding motif is associated with elevated hemoglobin F. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(13): 4386-4393.

CHEUNG W.L., BRIGGS S.D. and ALLIS C.D. Acetylation and chromosomal functions. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12(3): 326-333.

CHIBA T., IKAWA Y. and TODOKORO K. GATA-1 transactivates erythropoietin receptor gene, and erythropoietin receptor-mediated signals enhance GATA-1 gene expression. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(14): 3843-3848.

CHOE K.S., UJHELLY O., WONTAKAL S.N. and SKOULTCHI A.I. PU.1 directly regulates cdk6 gene expression, linking the cell proliferation and differentiation programs in erythroid cells. *The Journal of biological chemistry*, 2010, 285(5): 3044-3052.

CHOONG M.L., YANG H.H. and MCNIECE I. MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis. *Exp Hematol*, 2007, 35(4): 551-564.

CHOU S.T., KHANDROS E., BAILEY L.C., NICHOLS K.E., VAKOC C.R., YAO Y., HUANG Z., CRISPINO J.D., HARDISON R.C., BLOBEL G.A. and WEISS M.J. Graded repression of PU.1/Sfp1 gene transcription by GATA factors regulates hematopoietic cell fate. *Blood*, 2009, 114(5): 983-994.

COLLAVIN L., GOSTISSA M., AVOLIO F., SECCO P., RONCHI A., SANTORO C. and DEL SAL G. Modification of the erythroid transcription factor GATA-1 by SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(24): 8870-8875.

COOPER A.C., MIKHAIL A., LETHBRIDGE M.W., KEMENY D.M. and MACDOUGALL I.C. Increased expression of erythropoiesis inhibiting cytokines (IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10, and IL-13) by T cells in patients exhibiting a poor response to erythropoietin therapy. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(7): 1776-1784.

CRISPINO J.D., LODISH M.B., MACKAY J.P. and ORKIN S.H. Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation: the GATA-1:FOG complex. *Mol Cell*, 1999, 3(2): 219-228.

CROSSLEY M., MERIKA M. and ORKIN S.H. Self-association of the erythroid transcription factor GATA-1 mediated by its zinc finger domains. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(5): 2448-2456.

D

DAHL R. and SIMON M.C. The importance of PU.1 concentration in hematopoietic lineage commitment and maturation. *Blood Cells Mol Dis*, 2003, 31(2): 229-233.

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

DE BOTTON S., SABRI S., DAUGAS E., ZERMATI Y., GUIDOTTI J.E., HERMINE O., KROEMER G., VAINCHENKER W. and DEBILI N. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*, 2002, 100(4): 1310-1317.

DE MARIA R., ZEUNER A., ERAMO A., DOMENICHELLI C., BONCI D., GRIGNANI F., SRINIVASULA S.M., ALNEMRI E.S., TESTA U. and PESCHLE C. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*, 1999, 401(6752): 489-493.

DE THONEL A., VANDEKERCKHOVE J., LANNEAU D., SELVAKUMAR S., COURTOIS G., HAZOUME A., BRUNET M., MAUREL S., HAMMANN A., RIBEIL J.A., ZERMATI Y., GABET A.S., BOYES J., SOLARY E., HERMINE O. and GARRIDO C. HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation. *Blood*, 2010, 116(1): 85-96.

DEKOTER R.P., KAMATH M.B. and HOUSTON I.B. Analysis of concentration-dependent functions of PU.1 in hematopoiesis using mouse models. *Blood Cells Mol Dis*, 2007, 39(3): 316-320.

DEL VECCHIO G.C., GIORDANI L., DE SANTIS A. and DE MATTIA D. Dyserythropoietic anemia and thrombocytopenia due to a novel mutation in GATA-1. *Acta Haematol*, 2005, 114(2): 113-116.

DICATO M. Anemia in cancer: some pathophysiological aspects. *Oncologist*, 2003, 8 Suppl 1: 19-21.

DIJON M., BARDIN F., MURATI A., BATOZ M., CHABANNON C. and TONNELLE C. The role of Ikaros in human erythroid differentiation. *Blood*, 2008, 111(3): 1138-1146.

DORE L.C., AMIGO J.D., DOS SANTOS C.O., ZHANG Z., GAI X., TOBIAS J.W., YU D., KLEIN A.M., DORMAN C., WU W., HARDISON R.C., PAW B.H. and WEISS M.J. A GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(9): 3333-3338.

DRUEKE T. Hyporesponsiveness to recombinant human erythropoietin. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 2001, 16 Suppl 7: 25-28.

DU T. and ZAMORE P.D. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*, 2005, 132(21): 4645-4652.

DUBEY S., SHUKLA P. and NITYANAND S. Expression of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in bone marrow T cells and their levels in bone marrow plasma in patients with aplastic anemia. *Ann Hematol*, 2005, 84(9): 572-577.

DUFOUR C., CORCIONE A., SVAHN J., HAUPT R., POGGI V., BEKA'SSY A.N., SCIME R., PISTORIO A. and PISTOIA V. TNF-alpha and IFN-gamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis in vitro. *Blood*, 2003, 102(6): 2053-2059.

E

EBERT B.L. and BUNN H.F. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood*, 1999, 94(6): 1864-1877.

EGRIE J.C. and BROWNE J.K. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Nephrol Dial Transplant*, 2001, 16 Suppl 3: 3-13.

ELAGIB K.E., RACKE F.K., MOGASS M., KHETAWAT R., DELEHANTY L.L. and GOLDFARB A.N. RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood*, 2003, 101(11): 4333-4341.

ELLIOTT M.J., MAINI R.N., FELDMANN M., KALDEN J.R., ANTONI C., SMOLEN J.S., LEEB B., BREEDVELD F.C., MACFARLANE J.D., BIJL H. and ET AL. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 1994, 344(8930): 1105-1110.

EVANS T., REITMAN M. and FELSENFELD G. An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, 85(16): 5976-5980.

F

FAN Q., LEUTHER K.K., HOLMES C.P., FONG K.L., ZHANG J., VELKOVSKA S., CHEN M.J., MORTENSEN R.B., LEU K., GREEN J.M., SCHATZ P.J. and WOODBURN K.W. Preclinical evaluation of Hematide, a novel erythropoiesis stimulating agent, for the treatment of anemia. *Experimental hematology*, 2006, 34(10): 1303-1311.

FANDREY J. Erythropoietin receptors on tumor cells: what do they mean? *Oncologist*, 2008, 13 Suppl 3: 16-20.

FAZI F., ROSA A., FATICA A., GELMETTI V., DE MARCHIS M.L., NERVI C. and BOZZONI I. A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell*, 2005, 123(5): 819-831.

FELDMANN M., BRENNAN F.M. and MAINI R.N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*, 1996, 14: 397-440.

FELLI N., FONTANA L., PELOSI E., BOTTA R., BONCI D., FACCHIANO F., LIUZZI F., LULLI V., MORSILLI O., SANTORO S., VALTIERI M., CALIN G.A., LIU C.G., SORRENTINO A., CROCE C.M. and PESCHLE C. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(50): 18081-18086.

FERRARI G., CUSELLA-DE ANGELIS G., COLETTA M., PAOLUCCI E., STORNAIUOLO A., COSSU G. and MAVILIO F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 1998, 279(5356): 1528-1530.

FERREIRA R., OHNEDA K., YAMAMOTO M. and PHILIPSEN S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(4): 1215-1227.

FERREIRA R., WAI A., SHIMIZU R., GILLEMANS N., ROTTIER R., VON LINDERN M., OHNEDA K., GROSVELD F., YAMAMOTO M. and PHILIPSEN S. Dynamic regulation of Gata factor levels is more important than their identity. *Blood*, 2007, 109(12): 5481-5490.

FRESON K., DEVRIENDT K., MATTHIJS G., VAN HOOF A., DE VOS R., THYS C., MINNER K., HOYLAERTS M.F., VERMYLEN J. and VAN GEET C. Platelet characteristics in patients with X-linked macrothrombocytopenia because of a novel GATA1 mutation. *Blood*, 2001, 98(1): 85-92.

FRESON K., MATTHIJS G., THYS C., MARIEN P., HOYLAERTS M.F., VERMYLEN J. and VAN GEET C. Different substitutions at residue D218 of the X-linked transcription factor GATA1 lead to altered clinical severity of macrothrombocytopenia and anemia and are associated with variable skewed X inactivation. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(2): 147-152.

FRIESS H., GUO X.Z., NAN B.C., KLEEFF O. and BUCHLER M.W. Growth factors and cytokines in pancreatic carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 880: 110-121.

FUJIWARA Y., BROWNE C.P., CUNNIFF K., GOFF S.C. and ORKIN S.H. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(22): 12355-12358.

FUJIWARA Y., CHANG A.N., WILLIAMS A.M. and ORKIN S.H. Functional overlap of GATA-1 and GATA-2 in primitive hematopoietic development. *Blood*, 2004, 103(2): 583-585.

G

GARCIA J., LEMERCIER B., ROMAN-ROMAN S. and RAWADI G. A Mycoplasma fermentans-derived synthetic lipopeptide induces AP-1 and NF-kappaB activity and cytokine secretion in macrophages via the activation of mitogen-activated protein kinase pathways. *The Journal of biological chemistry*, 1998, 273(51): 34391-34398.

GARZON R., PICHIORRI F., PALUMBO T., IULIANO R., CIMMINO A., AQEILAN R., VOLINIA S., BHATT D., ALDER H., MARCUCCI G., CALIN G.A., LIU C.G., BLOOMFIELD C.D., ANDREEFF M. and CROCE C.M. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(13): 5078-5083.

GEORGOPOULOS K., BIGBY M., WANG J.H., MOLNAR A., WU P., WINANDY S. and SHARPE A. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell*, 1994, 79(1): 143-156.

GEORGOPOULOS K., MOORE D.D. and DERFLER B. Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science*, 1992, 258(5083): 808-812.

GERSUK G.M., BECKHAM C., LOKEN M.R., KIENER P., ANDERSON J.E., FARRAND A., TROUTT A.B., LEDBETTER J.A. and DEEG H.J. A role for tumour necrosis factor-alpha, Fas and Fas-Ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*, 1998, 103(1): 176-188.

GLASPY J., VADHAN-RAJ S., PATEL R., BOSSERMAN L., HU E., LLOYD R.E., BOCCIA R.V., TOMITA D. and ROSSI G. Randomized comparison of every-2-week darbepoetin alfa and weekly epoetin alfa for the treatment of chemotherapy-induced anemia: the 20030125 Study Group Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2006, 24(15): 2290-2297.

GLASPY J.A. Cancer patient survival and erythropoietin. *J Natl Compr Canc Netw*, 2005, 3(6): 796-804.

GRASS J.A., BOYER M.E., PAL S., WU J., WEISS M.J. and BRESNICK E.H. GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(15): 8811-8816.

GREGOLI P.A. and BONDURANT M.C. Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythroid progenitors. *J Cell Physiol*, 1999, 178(2): 133-143.

GREGORY C.J. and EAVES A.C. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood*, 1978, 51(3): 527-537.

GREGORY R.C., TAXMAN D.J., SESHASAYEE D., KENSINGER M.H., BIEKER J.J. and WOJCHOWSKI D.M. Functional interaction of GATA1 with erythroid Kruppel-like factor and Sp1 at defined erythroid promoters. *Blood*, 1996, 87(5): 1793-1801.

GREGORY T., YU C., MA A., ORKIN S.H., BLOBEL G.A. and WEISS M.J. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood*, 1999, 94(1): 87-96.

GROOPMAN J.E. and ITRI L.M. Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91(19): 1616-1634.

GUO Y., NIU C., BRESLIN P., TANG M., ZHANG S., WEI W., KINI A.R., PANER G.P., ALKAN S., MORRIS S.W., DIAZ M., STIFF P.J. and ZHANG J. c-Myc-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors. *Blood*, 2009, 114(10): 2097-2106.

GUTIERREZ L., LINDEBOOM F., LANGEVELD A., GROSVELD F., PHILIPSEN S. and WHYATT D. Homotypic signalling regulates Gata1 activity in the erythroblastic island. *Development*, 2004, 131(13): 3183-3193.

H

HAMMOND S.M. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett*, 2005, 579(26): 5822-5829.

HANSPAL M., SMOCKOVA Y. and UONG Q. Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages. *Blood*, 1998, 92(8): 2940-2950.

HARAOUI B. The anti-tumor necrosis factor agents are a major advance in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl*, 2005, 72: 46-47.

HARAOUI B. Differentiating the efficacy of tumor necrosis factor inhibitors. *J Rheumatol Suppl*, 2005, 74: 3-7.

HAYAKAWA F., TOWATARI M., OZAWA Y., TOMITA A., PRIVALSKY M.L. and SAITO H. Functional regulation of GATA-2 by acetylation. *Journal of leukocyte biology*, 2004, 75(3): 529-540.

HENKE M., LASZIG R., RUBE C., SCHAFFER U., HAASE K.D., SCHILCHER B., MOSE S., BEER K.T., BURGER U., DOUGHERTY C. and FROMMHOLD H. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2003, 362(9392): 1255-1260.

HERNANDEZ-HERNANDEZ A., RAY P., LITOS G., CIRO M., OTTOLENGHI S., BEUG H. and BOYES J. Acetylation and MAPK phosphorylation cooperate to regulate the degradation of active GATA-1. *Embo J*, 2006, 25(14): 3264-3274.

HOBERT O. Common logic of transcription factor and microRNA action. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29(9): 462-468.

HODGES V.M., RAINEY S., LAPPIN T.R. and MAXWELL A.P. Pathophysiology of anemia and erythrocytosis. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007, 64(2): 139-158.

HOLLANDA L.M., LIMA C.S., CUNHA A.F., ALBUQUERQUE D.M., VASSALLO J., OZELO M.C., JOAZEIRO P.P., SAAD S.T. and COSTA F.F. An inherited mutation leading to production of only the short isoform of GATA-1 is associated with impaired erythropoiesis. *Nat Genet*, 2006, 38(7): 807-812.

HOUSTON I.B., KAMATH M.B., SCHWEITZER B.L., CHLON T.M. and DEKOTER R.P. Reduction in PU.1 activity results in a block to B-cell development, abnormal myeloid proliferation, and neonatal lethality. *Experimental hematology*, 2007, 35(7): 1056-1068.

HUANG Z., DORE L.C., LI Z., ORKIN S.H., FENG G., LIN S. and CRISPINO J.D. GATA-2 reinforces megakaryocyte development in the absence of GATA-1. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(18): 5168-5180.

HUDDLESTON H., TAN B., YANG F.C., WHITE H., WENNING M.J., ORAZI A., YODER M.C., KAPUR R. and INGRAM D.A. Functional p85alpha gene is required for normal murine fetal erythropoiesis. *Blood*, 2003, 102(1): 142-145.

HUNG H.L., LAU J., KIM A.Y., WEISS M.J. and BLOBEL G.A. CREB-Binding protein acetylates hematopoietic transcription factor GATA-1 at functionally important sites. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(5): 3496-3505.

I

IAVARONE A., KING E.R., DAI X.M., LEONE G., STANLEY E.R. and LASORELLA A. Retinoblastoma promotes definitive erythropoiesis by repressing Id2 in fetal liver macrophages. *Nature*, 2004, 432(7020): 1040-1045.

IKONOMI P., RIVERA C.E., RIORDAN M., WASHINGTON G., SCHECHTER A.N. and NOGUCHI C.T. Overexpression of GATA-2 inhibits erythroid and promotes megakaryocyte differentiation. *Exp Hematol*, 2000, 28(12): 1423-1431.

ITO E., TOKI T., ISHIHARA H., OHTANI H., GU L., YOKOYAMA M., ENGEL J.D. and YAMAMOTO M. Erythroid transcription factor GATA-1 is abundantly transcribed in mouse testis. *Nature*, 1993, 362(6419): 466-468.

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

IWASAKI H., MIZUNO S., WELLS R.A., CANTOR A.B., WATANABE S. and AKASHI K. GATA-1 converts lymphoid and myelomonocytic progenitors into the megakaryocyte/erythrocyte lineages. *Immunity*, 2003, 19(3): 451-462.

IWASAKI H., SOMOZA C., SHIGEMATSU H., DUPREZ E.A., IWASAKI-ARAI J., MIZUNO S., ARINOBU Y., GEARY K., ZHANG P., DAYARAM T., FENYUS M.L., ELF S., CHAN S., KASTNER P., HUETTNER C.S., MURRAY R., TENEN D.G. and AKASHI K. Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood*, 2005, 106(5): 1590-1600.

J

JACOBS K., SHOEMAKER C., RUDERSDORF R., NEILL S.D., KAUFMAN R.J., MUFSON A., SEEHRA J., JONES S.S., HEWICK R., FRITSCH E.F. and ET AL. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*, 1985, 313(6005): 806-810.

JAYAPAL S.R., LEE K.L., JI P., KALDIS P., LIM B. and LODISH H.F. Down-regulation of Myc is essential for terminal erythroid maturation. *The Journal of biological chemistry*, 2010, 285(51): 40252-40265.

JI X., KONG J., CARSTENS R.P. and LIEBHABER S.A. The 3' untranslated region complex involved in stabilization of human alpha-globin mRNA assembles in the nucleus and serves an independent role as a splice enhancer. *Molecular and cellular biology*, 2007, 27(9): 3290-3302.

JOHNSON R.A., WADDELOW T.A., CARO J., OLIFF A. and ROODMAN G.D. Chronic exposure to tumor necrosis factor in vivo preferentially inhibits erythropoiesis in nude mice. *Blood*, 1989, 74(1): 130-138.

K

KACZYNSKI J., COOK T. and URRUTIA R. Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol*, 2003, 4(2): 206.

KADRI Z., MAOUCHE-CHRETIEN L., ROOKE H.M., ORKIN S.H., ROMEO P.H., MAYEUX P., LEBOULCH P. and CHRETIEN S. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt induced by erythropoietin renders the erythroid differentiation factor GATA-1 competent for TIMP-1 gene transactivation. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(17): 7412-7422.

KAWANE K., FUKUYAMA H., KONDOH G., TAKEDA J., OHSAWA Y., UCHIYAMA Y. and NAGATA S. Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science*, 2001, 292(5521): 1546-1549.

KIM V.N. and NAM J.W. Genomics of microRNA. *Trends Genet*, 2006, 22(3): 165-173.

KITAMURA T., TANGE T., TERASAWA T., CHIBA S., KUWAKI T., MIYAGAWA K., PIAO Y.F., MIYAZONO K., URABE A. and TAKAKU F. Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol*, 1989, 140(2): 323-334.

KLEIN C.B. and COSTA M. DNA methylation and gene expression: introduction and overview. *Mutat Res*, 1997, 386(2): 103-105.

KNIGHT K., WADE S. and BALDUCCI L. Prevalence and outcomes of anemia in cancer: a systematic review of the literature. *Am J Med*, 2004, 116 Suppl 7A: 11S-26S.

KNOBLER H. and SCHATTNER A. TNF- α , chronic hepatitis C and diabetes: a novel triad. *Qjm*, 2005, 98(1): 1-6.

KOBAYASHI M. and YAMAMOTO M. Regulation of GATA1 gene expression. *J Biochem*, 2007, 142(1): 1-10.

KOCHENDOERFER G.G., CHEN S.Y., MAO F., CRESSMAN S., TRAVIGLIA S., SHAO H., HUNTER C.L., LOW D.W., CAGLE E.N., CARNEVALI M., GUERIGUIAN V., KEOGH P.J., PORTER H., STRATTON S.M., WIEDEKE M.C., WILKEN J., TANG J., LEVY J.J., MIRANDA L.P., CRNOGORAC M.M., KALBAG S., BOTTI P., SCHINDLER-HORVAT J., SAVATSKI L., ADAMSON J.W., KUNG A., KENT S.B. and BRADBURNE J.A. Design and chemical synthesis of a homogeneous polymer-modified erythropoiesis protein. *Science*, 2003, 299(5608): 884-887.

KOLBUS A., PILAT S., HUSAK Z., DEINER E.M., STENGL G., BEUG H. and BACCARINI M. Raf-1 antagonizes erythroid differentiation by restraining caspase activation. *The Journal of experimental medicine*, 2002, 196(10): 1347-1353.

KOSAKA N., SUGIURA K., YAMAMOTO Y., YOSHIOKA Y., MIYAZAKI H., KOMATSU N., OCHIYA T. and KATO T. Identification of erythropoietin-induced microRNAs in haematopoietic cells during erythroid differentiation. *Br J Haematol*, 2008, 142(2): 293-300.

KOTKOW K.J. and ORKIN S.H. Dependence of globin gene expression in mouse erythroleukemia cells on the NF-E2 heterodimer. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(8): 4640-4647.

KOURY M.J., SAWYER S.T. and BRANDT S.J. New insights into erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*, 2002, 9(2): 93-100.

KULESSA H., FRAMPTON J. and GRAF T. GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboplasts, and erythroblasts. *Genes Dev*, 1995, 9(10): 1250-1262.

KURZROCK R. The role of cytokines in cancer-related fatigue. *Cancer*, 2001, 92(6 Suppl): 1684-1688.

L

LA FERLA K., REIMANN C., JELKMANN W. and HELLWIG-BURGEL T. Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-kappaB. *Faseb J*, 2002, 16(13): 1811-1813.

- LACOMBE C. Resistance to erythropoietin. *The New England journal of medicine*, 1996, 334(10): 660-662.
- LAIOSA C.V., STADTFELD M., XIE H., DE ANDRES-AGUAYO L. and GRAF T. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors. *Immunity*, 2006, 25(5): 731-744.
- LAMONICA J.M., VAKOC C.R. and BLOBEL G.A. Acetylation of GATA-1 is required for chromatin occupancy. *Blood*, 2006, 108(12): 3736-3738.
- LASLO P., SPOONER C.J., WARMFLASH A., LANCKI D.W., LEE H.J., SCIAMMAS R., GANTNER B.N., DINNER A.R. and SINGH H. Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell*, 2006, 126(4): 755-766.
- LAVOIE J.N., HICKEY E., WEBER L.A. and LANDRY J. Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *The Journal of biological chemistry*, 1993, 268(32): 24210-24214.
- LEE G., LO A., SHORT S.A., MANKELOW T.J., SPRING F., PARSONS S.F., YAZDANBAKHSH K., MOHANDAS N., ANSTEE D.J. and CHASIS J.A. Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation. *Blood*, 2006, 108(6): 2064-2071.
- LEE R.C., FEINBAUM R.L. and AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- LEE Y., AHN C., HAN J., CHOI H., KIM J., YIM J., LEE J., PROVOST P., RADMARK O., KIM S. and KIM V.N. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003, 425(6956): 415-419.
- LEE Y., KIM M., HAN J., YEOM K.H., LEE S., BAEK S.H. and KIM V.N. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 2004, 23(20): 4051-4060.
- LEWIS B.P., BURGE C.B. and BARTEL D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005, 120(1): 15-20.
- LEWIS B.P., SHIH I.H., JONES-RHOADES M.W., BARTEL D.P. and BURGE C.B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 2003, 115(7): 787-798.
- LEYLAND-JONES B., SEMIGLAZOV V., PAWLICKI M., PIENKOWSKI T., TJULANDIN S., MANIKHAS G., MAKHSON A., ROTH A., DODWELL D., BASELGA J., BIAKHOV M., VALUCKAS K., VOZNYI E., LIU X. and VERCAMMEN E. Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study. *J Clin Oncol*, 2005, 23(25): 5960-5972.
- LI Z., GODINHO F.J., KLUSMANN J.H., GARRIGA-CANUT M., YU C. and ORKIN S.H. Developmental stage-selective effect of somatically mutated leukemogenic transcription factor GATA1. *Nat Genet*, 2005, 37(6): 613-619.
- LIBREGTS S.F., GUTIERREZ L., DE BRUIN A.M., WENSVEEN F.M., PAPADOPOULOS P., VAN IJCKEN W., OZGUR Z., PHILIPSEN S. and NOLTE M.A. Chronic IFN γ production in mice induces anemia by reducing erythrocyte lifespan and inhibiting erythropoiesis through an IRF-1/PU.1-axis. *Blood*, 2011,
- LIEW C.K., SIMPSON R.J., KWAN A.H., CROFTS L.A., LOUGHLIN F.E., MATTHEWS J.M., CROSSLEY M. and MACKAY J.P. Zinc fingers as protein recognition motifs: structural basis for the GATA-1/friend of GATA interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(3): 583-588.
- LIEW C.W., RAND K.D., SIMPSON R.J., YUNG W.W., MANSFIELD R.E., CROSSLEY M., PROETORIUS-IBBA M., NERLOV C., POULSEN F.M. and MACKAY J.P. Molecular analysis of the interaction between the hematopoietic master transcription factors GATA-1 and PU.1. *The Journal of biological chemistry*, 2006, 281(38): 28296-28306.

LIN F.K., SUGGS S., LIN C.H., BROWNE J.K., SMALLING R., EGRIE J.C., CHEN K.K., FOX G.M., MARTIN F., STABINSKY Z. and ET AL. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985, 82(22): 7580-7584.

LITTLEWOOD T.J., BAJETTA E., NORTIER J.W., VERCAMMEN E. and RAPOPORT B. Effects of epoetin alfa on hematologic parameters and quality of life in cancer patients receiving nonplatinum chemotherapy: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol*, 2001, 19(11): 2865-2874.

LIU J.J., HOU S.C. and SHEN C.K. Erythroid gene suppression by NF-kappa B. *The Journal of biological chemistry*, 2003, 278(21): 19534-19540.

LIU L.R., DU Z.W., ZHAO H.L., LIU X.L., HUANG X.D., SHEN J., JU L.M., FANG F.D. and ZHANG J.W. T to C substitution at -175 or -173 of the gamma-globin promoter affects GATA-1 and Oct-1 binding in vitro differently but can independently reproduce the hereditary persistence of fetal hemoglobin phenotype in transgenic mice. *J Biol Chem*, 2005, 280(9): 7452-7459.

LOCATELLI F. and DEL VECCHIO L. Hematide for the treatment of chronic kidney disease-related anemia. *Expert Rev Hematol*, 2009, 2(4): 377-383.

LOZZIO C.B. and LOZZIO B.B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 1975, 45(3): 321-334.

LUDLOW L.B., SCHICK B.P., BUDARF M.L., DRISCOLL D.A., ZACKAI E.H., COHEN A. and KONKLE B.A. Identification of a mutation in a GATA binding site of the platelet glycoprotein Ibbeta promoter resulting in the Bernard-Soulier syndrome. *J Biol Chem*, 1996, 271(36): 22076-22080.

LUND E., GUTTINGER S., CALADO A., DAHLBERG J.E. and KUTAY U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 2004, 303(5654): 95-98.

LUNDBY C. and OLSEN N.V. Effects of recombinant human erythropoietin in normal humans. *The Journal of physiology*, 2011, 589(Pt 6): 1265-1271.

M

MACDOUGALL I.C. CERA (Continuous Erythropoietin Receptor Activator): a new erythropoiesis-stimulating agent for the treatment of anemia. *Curr Hematol Rep*, 2005, 4(6): 436-440.

MACDOUGALL I.C. and COOPER A.C. Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 2002, 17 Suppl 11: 39-43.

MACDOUGALL I.C. and COOPER A.C. Hyporesponsiveness to erythropoietic therapy due to chronic inflammation. *Eur J Clin Invest*, 2005, 35 Suppl 3: 32-35.

MACDOUGALL I.C., ROSSERT J., CASADEVALL N., STEAD R.B., DULIEGE A.M., FROISSART M. and ECKARDT K.U. A peptide-based erythropoietin-receptor agonist for pure red-cell aplasia. *The New England journal of medicine*, 2009, 361(19): 1848-1855.

MAJEWSKI I.J., METCALF D., MIELKE L.A., KREBS D.L., ELLIS S., CARPINELLI M.R., MIFSUD S., DI RAGO L., CORBIN J., NICOLA N.A., HILTON D.J. and ALEXANDER W.S. A mutation in the translation initiation codon of Gata-1 disrupts megakaryocyte maturation and causes thrombocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(38): 14146-14151.

MAK K.S., FUNNELL A.P., PEARSON R.C. and CROSSLEY M. PU.1 and Haematopoietic Cell Fate: Dosage Matters. *Int J Cell Biol*, 2011, 2011: 808524.

MANCO L., RIBEIRO M.L., MAXIMO V., ALMEIDA H., COSTA A., FREITAS O., BARBOT J., ABADE A. and TAMAGNINI G. A new PKLR gene mutation in the R-type promoter region affects the gene transcription causing pyruvate kinase deficiency. *Br J Haematol*, 2000, 110(4): 993-997.

MANDAL D., BAUDIN-CREUZA V., BHATTACHARYYA A., PATHAK S., DELAUNAY J., KUNDU M. and BASU J. Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3). *J Biol Chem*, 2003, 278(52): 52551-52558.

MANN J., KESSLER M., VILLA G., MARTINEZ-CASTELAO A., FELDT-RASMUSSEN B., CRUZ J., HORL W.H., MATTIN C., PRAML C. and WILKIE M. Darbepoetin alfa once every 2 weeks for treatment of anemia in dialysis patients: a combined analysis of eight multicenter trials. *Clin Nephrol*, 2007, 67(3): 140-148.

MANTOVANI A., ALLAVENA P., SICA A. and BALKWILL F. Cancer-related inflammation. *Nature*, 2008, 454(7203): 436-444.

MARTIN D.I., ZON L.I., MUTTER G. and ORKIN S.H. Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature*, 1990, 344(6265): 444-447.

MARTIN P. and PAPAYANNOPOULOU T. HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression. *Science*, 1982, 216(4551): 1233-1235.

MATSUDA M., SAKAMOTO N. and FUKUMAKI Y. Delta-thalassemia caused by disruption of the site for an erythroid-specific transcription factor, GATA-1, in the delta-globin gene promoter. *Blood*, 1992, 80(5): 1347-1351.

MATSUMURA I., KITAMURA T., WAKAO H., TANAKA H., HASHIMOTO K., ALBANESE C., DOWNWARD J., PESTELL R.G. and KANAKURA Y. Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. *EMBO J*, 1999, 18(5): 1367-1377.

MAXWELL A.P. Novel erythropoiesis-stimulating protein in the management of the anemia of chronic renal failure. *Kidney international*, 2002, 62(2): 720-729.

MAXWELL P.H., OSMOND M.K., PUGH C.W., HERYET A., NICHOLLS L.G., TAN C.C., DOE B.G., FERGUSON D.J., JOHNSON M.H. and RATCLIFFE P.J. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int*, 1993, 44(5): 1149-1162.

MCGAHON A., BISSONNETTE R., SCHMITT M., COTTER K.M., GREEN D.R. and COTTER T.G. BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood*, 1994, 83(5): 1179-1187.

MCKERCHER S.R., TORBETT B.E., ANDERSON K.L., HENKEL G.W., VESTAL D.J., BARIBAULT H., KLEMSZ M., FEENEY A.J., WU G.E., PAIGE C.J. and MAKI R.A. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *The EMBO journal*, 1996, 15(20): 5647-5658.

MEHAFFEY M.G., NEWTON A.L., GANDHI M.J., CROSSLEY M. and DRACHMAN J.G. X-linked thrombocytopenia caused by a novel mutation of GATA-1. *Blood*, 2001, 98(9): 2681-2688.

MEISTER G. and TUSCHL T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 2004, 431(7006): 343-349.

MERCADANTE S., GEBBIA V., MARRAZZO A. and FILOSTO S. Anaemia in cancer: pathophysiology and treatment. *Cancer Treat Rev*, 2000, 26(4): 303-311.

MERIKA M. and ORKIN S.H. DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(7): 3999-4010.

MIYAKE T., KUNG C.K. and GOLDWASSER E. Purification of human erythropoietin. *The Journal of biological chemistry*, 1977, 252(15): 5558-5564.

MOI P., LOUDIANOS G., LAVINHA J., MURRU S., COSSU P., CASU R., OGGIANO L., LONGINOTTI M., CAO A. and PIRASTU M. Delta-thalassemia due to a mutation in an erythroid-specific binding protein sequence 3' to the delta-globin gene. *Blood*, 1992, 79(2): 512-516.

MOLKENTIN J.D. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem*, 2000, 275(50): 38949-38952.

MOLNAR A. and GEORGOPOULOS K. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(12): 8292-8303.

MONTICELLI S., ANSEL K.M., XIAO C., SOCCI N.D., KRICHEVSKY A.M., THAI T.H., RAJEWSKY N., MARKS D.S., SANDER C., RAJEWSKY K., RAO A. and KOSIK K.S. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol*, 2005, 6(8): R71.

MOORE R.J., OWENS D.M., STAMP G., ARNOTT C., BURKE F., EAST N., HOLDSWORTH H., TURNER L., ROLLINS B., PASPARAKIS M., KOLLIAS G. and BALKWILL F. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med*, 1999, 5(7): 828-831.

MORCEAU F., SCHNEKENBURGER M., BLASIUS R., BUCK I., DICATO M. and DIEDERICH M. Tumor necrosis factor alpha inhibits aclacinomycin A-induced erythroid differentiation of K562 cells via GATA-1. *Cancer Lett*, 2006, 240(2): 203-212.

MORCEAU F., SCHNEKENBURGER M., DICATO M. and DIEDERICH M. GATA-1: friends, brothers, and coworkers. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1030: 537-554.

MOREAU-GACHELIN F., WENDLING F., MOLINA T., DENIS N., TITEUX M., GRIMBER G., BRIAND P., VAINCHENKER W. and TAVITIAN A. Spi-1/PU.1 transgenic mice develop multistep erythroleukemias. *Molecular and cellular biology*, 1996, 16(5): 2453-2463.

MORI M., UCHIDA M., WATANABE T., KIRITO K., HATAKE K., OZAWA K. and KOMATSU N. Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-xL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling. *J Cell Physiol*, 2003, 195(2): 290-297.

MUELLER B.U., PABST T., OSATO M., ASOU N., JOHANSEN L.M., MINDEN M.D., BEHRE G., HIDDEMANN W., ITO Y. and TENEN D.G. Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood*, 2002, 100(3): 998-1007.

MYKLEBUST J.H., BLOMHOFF H.K., RUSTEN L.S., STOKKE T. and SMELAND E.B. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*, 2002, 30(9): 990-1000.

N

NAGATA Y., TAKAHASHI N., DAVIS R.J. and TODOKORO K. Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood*, 1998, 92(6): 1859-1869.

NAKANO Y., IMAGAWA S., MATSUMOTO K., STOCKMANN C., OBARA N., SUZUKI N., DOI T., KODAMA T., TAKAHASHI S., NAGASAWA T. and YAMAMOTO M. Oral administration of K-11706 inhibits GATA binding activity, enhances hypoxia-inducible factor 1 binding activity, and restores indicators in an in vivo mouse model of anemia of chronic disease. *Blood*, 2004, 104(13): 4300-4307.

NERLOV C., QUERFURTH E., KULESSA H. and GRAF T. GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood*, 2000, 95(8): 2543-2551.

NICHOGIANNOPOULOU A., TREVISAN M., NEBEN S., FRIEDRICH C. and GEORGOPOULOS K. Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J Exp Med*, 1999, 190(9): 1201-1214.

NICHOLS K.E., CRISPINO J.D., PONCZ M., WHITE J.G., ORKIN S.H., MARIS J.M. and WEISS M.J. Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet*, 2000, 24(3): 266-270.

NICOLAS G., CHAUVET C., VIATTE L., DANAN J.L., BIGARD X., DEVAUX I., BEAUMONT C., KAHN A. and VAULONT S. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*, 2002, 110(7): 1037-1044.

NICOLIS S., BERTINI C., RONCHI A., CROTTA S., LANFRANCO L., MORONI E., GIGLIONI B. and OTTOLENGHI S. An erythroid specific enhancer upstream to the gene encoding the cell-type specific transcription factor GATA-1. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(19): 5285-5291.

O

OBAYA A.J., KOTENKO I., COLE M.D. and SEDIVY J.M. The proto-oncogene c-myc acts through the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27(Kip1) to facilitate the activation of Cdk4/6 and early G(1) phase progression. *The Journal of biological chemistry*, 2002, 277(34): 31263-31269.

OBERMUELLER E., VOSELER S., FUSENIG N.E. and MUELLER M.M. Cooperative autocrine and paracrine functions of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the progression of skin carcinoma cells. *Cancer Res*, 2004, 64(21): 7801-7812.

OHNEDA K. and YAMAMOTO M. Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. *Acta Haematol*, 2002, 108(4): 237-245.

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

OSTERBORG A., AAPRO M., CORNES P., HASELBECK A., HAYWARD C.R. and JELKMANN W. Preclinical studies of erythropoietin receptor expression in tumour cells: impact on clinical use of erythropoietic proteins to correct cancer-related anaemia. *Eur J Cancer*, 2007, 43(3): 510-519.

P

PAPACHATZOPOULOU A., KAIMAKIS P., POURFARZAD F., MENOUNOS P.G., EVANGELAKOU P., KOLLIA P., GROSVELD F.G. and PATRINOS G.P. Increased gamma-globin gene expression in beta-thalassemia intermedia patients correlates with a mutation in 3'HS1. *Am J Hematol*, 2007, 82(11): 1005-1009.

PAPADAKI H.A., KRITIKOS H.D., VALATAS V., BOUMPAS D.T. and ELIOPOULOS G.D. Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis is associated with increased apoptosis of bone marrow erythroid cells: improvement following anti-tumor necrosis factor-alpha antibody therapy. *Blood*, 2002, 100(2): 474-482.

PAPETTI M., WONTAKAL S.N., STOPKA T. and SKOULTCHI A.I. GATA-1 directly regulates p21 gene expression during erythroid differentiation. *Cell Cycle*, 2010, 9(10): 1972-1980.

PARTINGTON G.A. and PATIENT R.K. Phosphorylation of GATA-1 increases its DNA-binding affinity and is correlated with induction of human K562 erythroleukaemia cells. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(4): 1168-1175.

PASE L., LAYTON J.E., KLOOSTERMAN W.P., CARRADICE D., WATERHOUSE P.M. and LIESCHKE G.J. miR-451 regulates zebrafish erythroid maturation in vivo via its target gata2. *Blood*, 2009, 113(8): 1794-1804.

PAVESE I., SATTA F., TODI F., DI PALMA M., PIERGROSSI P., MIGLIORE A., PISELLI P., BORGHESI R., MANCINO G., BRUNETTI E. and ALIMONTI A. High serum levels of TNF-alpha and IL-6 predict the clinical outcome of treatment with human recombinant erythropoietin in anaemic cancer patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 2010, 21(7): 1523-1528.

PETERSEN B.E., BOWEN W.C., PATRENE K.D., MARS W.M., SULLIVAN A.K., MURASE N., BOGGS S.S., GREENBERGER J.S. and GOFF J.P. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 1999, 284(5417): 1168-1170.

PEVNY L., SIMON M.C., ROBERTSON E., KLEIN W.H., TSAI S.F., D'AGATI V., ORKIN S.H. and COSTANTINI F. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature*, 1991, 349(6306): 257-260.

PHILLIPS J.D., STEENSMA D.P., PULSIPHER M.A., SPANGRUDE G.J. and KUSHNER J.P. Congenital erythropoietic porphyria due to a mutation in GATA1: the first trans-acting mutation causative for a human porphyria. *Blood*, 2007, 109(6): 2618-2621.

PIKARSKY E., PORAT R.M., STEIN I., ABRAMOVITCH R., AMIT S., KASEM S., GUTKOVICH-PYEST E., URIELI-SHOVAL S., GALUN E. and BEN-NERIAH Y. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*, 2004, 431(7007): 461-466.

POLLARD J.W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(1): 71-78.

POLLI M., DAKIC A., LIGHT A., WU L., TARLINTON D.M. and NUTT S.L. The development of functional B lymphocytes in conditional PU.1 knock-out mice. *Blood*, 2005, 106(6): 2083-2090.

PORTA C., LARGHI P., RIMOLDI M., TOTARO M.G., ALLAVENA P., MANTOVANI A. and SICA A. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology*, 2009, 214(9-10): 761-777.

Q

QUERFURTH E., SCHUSTER M., KULESSA H., CRISPINO J.D., DODERLEIN G., ORKIN S.H., GRAF T. and NERLOV C. Antagonism between C/EBPbeta and FOG in eosinophil lineage commitment of multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev*, 2000, 14(19): 2515-2525.

R

REKHTMAN N., CHOE K.S., MATUSHANSKY I., MURRAY S., STOPKA T. and SKOULTCHI A.I. PU.1 and pRB interact and cooperate to repress GATA-1 and block erythroid differentiation. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(21): 7460-7474.

REKHTMAN N., RADPARVAR F., EVANS T. and SKOULTCHI A.I. Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes & development*, 1999, 13(11): 1398-1411.

RIBEIL J.A., ZERMATI Y., VANDEKERCKHOVE J., CATHELIN S., KERSUAL J., DUSSIOT M., COULON S., MOURA I.C., ZEUNER A., KIRKEGAARD-SORENSEN T., VARET B., SOLARY E., GARRIDO C. and HERMINE O. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*, 2007, 445(7123): 102-105.

RIZZO J.D., SOMERFIELD M.R., HAGERTY K.L., SEIDENFELD J., BOHLIUS J., BENNETT C.L., CELLA D.F., DJULBEGOVIC B., GOODE M.J., JAKUBOWSKI A.A., RARICK M.U., REGAN D.H. and LICHTIN A.E. Use of epoetin and darbepoetin in patients with cancer: 2007 American Society of Hematology/American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *Blood*, 2008, 111(1): 25-41.

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

ROMEO P.H., PRANDINI M.H., JOULIN V., MIGNOTTE V., PRENANT M., VAINCHENKER W., MARGUERIE G. and UZAN G. Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature*, 1990, 344(6265): 447-449.

ROSENBAUER F., WAGNER K., KUTOK J.L., IWASAKI H., LE BEAU M.M., OKUNO Y., AKASHI K., FIERING S. and TENEN D.G. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nature genetics*, 2004, 36(6): 624-630.

RYLSKI M., WELCH J.J., CHEN Y.Y., LETTING D.L., DIEHL J.A., CHODOSH L.A., BLOBEL G.A. and WEISS M.J. GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(14): 5031-5042.

S

SAMARAS A.T. and BENNETT C.L. Risks of Venous Thromboembolism and Mortality Associated With Erythropoiesis-Stimulating Agents for the Treatment of Cancer-Associated Anemia. *Am J Hematol Oncol*, 2008, 7(8): 327-332.

SAPETSCHNIG A., RISCHITOR G., BRAUN H., DOLL A., SCHERGAUT M., MELCHIOR F. and SUSKE G. Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO J*, 2002, 21(19): 5206-5215.

SCHEINFELD N. A comprehensive review and evaluation of the side effects of the tumor necrosis factor alpha blockers etanercept, infliximab and adalimumab. *J Dermatolog Treat*, 2004, 15(5): 280-294.

SCHREIBER E., MATTHIAS P., MULLER M.M. and SCHAFFNER W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17(15): 6419.

SCHURINGA J.J., CHUNG K.Y., MORRONE G. and MOORE M.A. Constitutive activation of STAT5A promotes human hematopoietic stem cell self-renewal and erythroid differentiation. *The Journal of experimental medicine*, 2004, 200(5): 623-635.

SCICCHITANO M.S., MCFARLAND D.C., TIERNEY L.A., BOYCE R.W., FRAZIER K.S., SCHWARTZ L.W. and THOMAS H.C. Role of p38 in regulation of hematopoiesis: effect of p38 inhibition on cytokine production and transcription factor activity in human bone marrow stromal cells. *Blood Cells Mol Dis*, 2008, 40(3): 370-380.

SCOTT E.W., SIMON M.C., ANASTASI J. and SINGH H. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*, 1994, 265(5178): 1573-1577.

SHIMIZU R. and YAMAMOTO M. Gene expression regulation and domain function of hematopoietic GATA factors. *Semin Cell Dev Biol*, 2005, 16(1): 129-136.

SHIRIHAI O.S., GREGORY T., YU C., ORKIN S.H. and WEISS M.J. ABC-me: a novel mitochondrial transporter induced by GATA-1 during erythroid differentiation. *The EMBO journal*, 2000, 19(11): 2492-2502.

SICA A. and BRONTE V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest*, 2007, 117(5): 1155-1166.

SIMMONS P.J., MASINOVSKY B., LONGENECKER B.M., BERENSON R., TOROK-STORB B. and GALLATIN W.M. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 1992, 80(2): 388-395.

SIVERTSEN E.A., HYSTAD M.E., GUTZKOW K.B., DOSEN G., SMELAND E.B., BLOMHOFF H.K. and MYKLEBUST J.H. PI3K/Akt-dependent Epo-induced signalling and target genes in human early erythroid progenitor cells. *Br J Haematol*, 2006, 135(1): 117-128.

SOCOLOVSKY M., FALLON A.E. and LODISH H.F. The prolactin receptor rescues EpoR^{-/-} erythroid progenitors and replaces EpoR in a synergistic interaction with c-kit. *Blood*, 1998, 92(5): 1491-1496.

SOCOLOVSKY M., NAM H., FLEMING M.D., HAASE V.H., BRUGNARA C. and LODISH H.F. Ineffective erythropoiesis in Stat5a^(-/-)5b^(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood*, 2001, 98(12): 3261-3273.

SOLIS C., AIZENCANG G.I., ASTRIN K.H., BISHOP D.F. and DESNICK R.J. Uroporphyrinogen III synthase erythroid promoter mutations in adjacent GATA1 and CP2 elements cause congenital erythropoietic porphyria. *J Clin Invest*, 2001, 107(6): 753-762.

SORDET O., REBE C., PLENCHETTE S., ZERMATI Y., HERMINE O., VAINCHENKER W., GARRIDO C., SOLARY E. and DUBREZ-DALOZ L. Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood*, 2002, 100(13): 4446-4453.

SPIVAK J.L. The anaemia of cancer: death by a thousand cuts. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(7): 543-555.

SPOONER C.J., CHENG J.X., PUJADAS E., LASLO P. and SINGH H. A recurrent network involving the transcription factors PU.1 and Gfi1 orchestrates innate and adaptive immune cell fates. *Immunity*, 2009, 31(4): 576-586.

STEAD R.B., LAMBERT J., WESSELS D., IWASHITA J.S., LEUTHER K.K., WOODBURN K.W., SCHATZ P.J., OKAMOTO D.M., NASO R. and DULIEGE A.M. Evaluation of the safety and pharmacodynamics of Hematide, a novel erythropoietic agent, in a phase 1, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study in healthy volunteers. *Blood*, 2006, 108(6): 1830-1834.

SURAWEERA N., MEIJNE E., MOODY J., CARVAJAL-CARMONA L.G., YOSHIDA K., POLLARD P., FITZGIBBON J., RICHES A., VAN LAAR T., HUISKAMP R., ROWAN A., TOMLINSON I.P. and SILVER A. Mutations of the PU.1 Ets domain are specifically associated with murine radiation-induced, but not human therapy-related, acute myeloid leukaemia. *Oncogene*, 2005, 24(22): 3678-3683.

SYTKOWSKI A.J., LUNN E.D., DAVIS K.L., FELDMAN L. and SIEKMAN S. Human erythropoietin dimers with markedly enhanced in vivo activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(3): 1184-1188.

SYTKOWSKI A.J., LUNN E.D., RISINGER M.A. and DAVIS K.L. An erythropoietin fusion protein comprised of identical repeating domains exhibits enhanced biological properties. *The Journal of biological chemistry*, 1999, 274(35): 24773-24778.

T

TAGHON T., YUI M.A. and ROTHENBERG E.V. Mast cell lineage diversion of T lineage precursors by the essential T cell transcription factor GATA-3. *Nat Immunol*, 2007, 8(8): 845-855.

TENEN D.G., HROMAS R., LICHT J.D. and ZHANG D.E. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood*, 1997, 90(2): 489-519.

TESTA U. Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia*, 2004, 18(7): 1176-1199.

THEISE N.D. Stem cell plasticity: recapping the decade, mapping the future. *Experimental hematology*, 2010, 38(7): 529-539.

THEISE N.D. and WILMUT I. Cell plasticity: flexible arrangement. *Nature*, 2003, 425(6953): 21.

TOWATARI M., CIRO M., OTTOLENGHI S., TSUZUKI S. and ENVER T. Involvement of mitogen-activated protein kinase in the cytokine-regulated phosphorylation of transcription factor GATA-1. *Hematol J*, 2004, 5(3): 262-272.

TSAI F.Y., KELLER G., KUO F.C., WEISS M., CHEN J., ROSENBLATT M., ALT F.W. and ORKIN S.H. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*, 1994, 371(6494): 221-226.

TSAI F.Y. and ORKIN S.H. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood*, 1997, 89(10): 3636-3643.

TSAI S.F., STRAUSS E. and ORKIN S.H. Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes Dev*, 1991, 5(6): 919-931.

TSANG A.P., FUJIWARA Y., HOM D.B. and ORKIN S.H. Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev*, 1998, 12(8): 1176-1188.

TSANG A.P., VISVADER J.E., TURNER C.A., FUJIWARA Y., YU C., WEISS M.J., CROSSLEY M. and ORKIN S.H. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell*, 1997, 90(1): 109-119.

TSOPRA O.A., ZIROS P.G., LAGADINO E.D., SYMEONIDIS A., KOURAKLIS-SYMEONIDIS A., THANOPOULOU E., ANGELOPOULOU M.K., VASSILAKOPOULOS T.P., PANGALIS G.A. and ZOUMBOS N.C. Disease-related anemia in chronic lymphocytic leukemia is not due to intrinsic defects of erythroid precursors: a possible pathogenetic role for tumor necrosis factor-alpha. *Acta Haematol*, 2009, 121(4): 187-195.

U

UDDIN S., AH-KANG J., ULASZEK J., MAHMUD D. and WICKREMA A. Differentiation stage-specific activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(1): 147-152.

V

VAN DULLEMEN H.M., VAN DEVENTER S.J., HOMMES D.W., BIJL H.A., JANSEN J., TYTGAT G.N. and WOODY J. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology*, 1995, 109(1): 129-135.

VERMA A., DEB D.K., SASSANO A., KAMBHAMPATI S., WICKREMA A., UDDIN S., MOHINDRU M., VAN BESIEN K. and PLATANIAS L.C. Cutting edge: activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway mediates cytokine-induced hemopoietic suppression in aplastic anemia. *Journal of immunology*, 2002, 168(12): 5984-5988.

VILCEK J. and FELDMANN M. Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends Pharmacol Sci*, 2004, 25(4): 201-209.

VON LAER D., COROVIC A., VOGT B., FEHSE B., ROSCHER S., RIMEK A., BAUM C. and OSTERTAG W. Loss of CD38 antigen on CD34+CD38+ cells during short-term culture. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 2000, 14(5): 947-948.

W

WADMAN I.A., OSADA H., GRUTZ G.G., AGULNICK A.D., WESTPHAL H., FORSTER A. and RABBITTS T.H. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *Embo J*, 1997, 16(11): 3145-3157.

WAGNER K.U., CLAUDIO E., RUCKER E.B., 3RD, RIEDLINGER G., BROUSSARD C., SCHWARTZBERG P.L., SIEBENLIST U. and HENNIGHAUSEN L. Conditional deletion of the Bcl-x gene from erythroid cells results in hemolytic anemia and profound splenomegaly. *Development*, 2000, 127(22): 4949-4958.

WANG G.L. and SEMENZA G.L. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*, 1993, 268(29): 21513-21518.

WANG J.M., LAI M.Z. and YANG-YEN H.F. Interleukin-3 stimulation of mcl-1 gene transcription involves activation of the PU.1 transcription factor through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Molecular and cellular biology*, 2003, 23(6): 1896-1909.

WANG Q., HUANG Z., XUE H., JIN C., JU X.L., HAN J.D. and CHEN Y.G. MicroRNA miR-24 inhibits erythropoiesis by targeting activin type I receptor ALK4. *Blood*, 2008, 111(2): 588-595.

WEI G.H., ZHAO G.W., SONG W., HAO D.L., LV X., LIU D.P. and LIANG C.C. Mechanisms of human gamma-globin transcriptional induction by apicidin involves p38 signaling to chromatin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 363(4): 889-894.

- WEIL M., JACOBSON M.D. and RAFF M.C. Are caspases involved in the death of cells with a transcriptionally inactive nucleus? Sperm and chicken erythrocytes. *J Cell Sci*, 1998, 111 (Pt 18): 2707-2715.
- WEIL M., RAFF M.C. and BRAGA V.M. Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr Biol*, 1999, 9(7): 361-364.
- WEISS M.J., KELLER G. and ORKIN S.H. Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev*, 1994, 8(10): 1184-1197.
- WEISS M.J. and ORKIN S.H. GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol*, 1995, 23(2): 99-107.
- WHYATT D., LINDEBOOM F., KARIS A., FERREIRA R., MILOT E., HENDRIKS R., DE BRUIJN M., LANGEVELD A., GRIBNAU J., GROSVELD F. and PHILIPSEN S. An intrinsic but cell-nonautonomous defect in GATA-1-overexpressing mouse erythroid cells. *Nature*, 2000, 406(6795): 519-524.
- WHYATT D.J., DEBOER E. and GROSVELD F. The two zinc finger-like domains of GATA-1 have different DNA binding specificities. *Embo J*, 1993, 12(13): 4993-5005.
- WHYATT D.J., KARIS A., HARKES I.C., VERKERK A., GILLEMANS N., ELEFANTY A.G., VAIRO G., PLOEMACHER R., GROSVELD F. and PHILIPSEN S. The level of the tissue-specific factor GATA-1 affects the cell-cycle machinery. *Genes Funct*, 1997, 1(1): 11-24.
- WICKREMA A. and CRISPINO J.D. Erythroid and megakaryocytic transformation. *Oncogene*, 2007, 26(47): 6803-6815.
- WIERENGA A.T., VELLENGA E. and SCHURINGA J.J. Maximal STAT5-induced proliferation and self-renewal at intermediate STAT5 activity levels. *Molecular and cellular biology*, 2008, 28(21): 6668-6680.
- WIERENGA A.T., VELLENGA E. and SCHURINGA J.J. Down-regulation of GATA1 uncouples STAT5-induced erythroid differentiation from stem/progenitor cell proliferation. *Blood*, 2010, 115(22): 4367-4376.
- WIGHTMAN B., HA I. and RUVKUN G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 1993, 75(5): 855-862.
- WIJGERDE M., GRIBNAU J., TRIMBORN T., NUEZ B., PHILIPSEN S., GROSVELD F. and FRASER P. The role of EKLF in human beta-globin gene competition. *Genes Dev*, 1996, 10(22): 2894-2902.
- WOJCHOWSKI D.M., GREGORY R.C., MILLER C.P., PANDIT A.K. and PIRCHER T.J. Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Experimental cell research*, 1999, 253(1): 143-156.
- WONTAKAL S.N., GUO X., WILL B., SHI M., RAHA D., MAHAJAN M.C., WEISSMAN S., SNYDER M., STEIDL U., ZHENG D. and SKOULTCHI A.I. A large gene network in immature erythroid cells is controlled by the myeloid and B cell transcriptional regulator PU.1. *PLoS Genet*, 2011, 7(6): e1001392.
- WOODBURN K.W., FAN Q., WINSLOW S., CHEN M.J., MORTENSEN R.B., CASADEVALL N., STEAD R.B. and SCHATZ P.J. Hematide is immunologically distinct from erythropoietin and corrects anemia induced by antierythropoietin antibodies in a rat pure red cell aplasia model. *Experimental hematology*, 2007, 35(8): 1201-1208.
- WRIGHT J.R., UNG Y.C., JULIAN J.A., PRITCHARD K.I., WHELAN T.J., SMITH C., SZECHTMAN B., ROA W., MULROY L., RUDINSKAS L., GAGNON B., OKAWARA G.S. and LEVINE M.N. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of erythropoietin in non-small-cell lung cancer with disease-related anemia. *J Clin Oncol*, 2007, 25(9): 1027-1032.
- WYCKOFF J., WANG W., LIN E.Y., WANG Y., PIXLEY F., STANLEY E.R., GRAF T., POLLARD J.W., SEGALL J. and CONDEELIS J. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res*, 2004, 64(19): 7022-7029.

X

XIAO W., KOIZUMI K., NISHIO M., ENDO T., OSAWA M., FUJIMOTO K., SATO I., SAKAI T., KOIKE T. and SAWADA K. Tumor necrosis factor-alpha inhibits generation of glycophorin A+ cells by CD34+ cells. *Exp Hematol*, 2002, 30(11): 1238-1247.

Y

YAMADA T., KIHARA-NEGISHI F., YAMAMOTO H., YAMAMOTO M., HASHIMOTO Y. and OIKAWA T. Reduction of DNA binding activity of the GATA-1 transcription factor in the apoptotic process induced by overexpression of PU.1 in murine erythroleukemia cells. *Exp Cell Res*, 1998, 245(1): 186-194.

YAN L., ANDERSON G.M., DEWITTE M. and NAKADA M.T. Therapeutic potential of cytokine and chemokine antagonists in cancer therapy. *Eur J Cancer*, 2006, 42(6): 793-802.

YASUDA Y., FUJITA Y., MATSUO T., KOINUMA S., HARA S., TAZAKI A., ONOZAKI M., HASHIMOTO M., MUSHI T., OGAWA K., FUJITA H., NAKAMURA Y., SHIOZAKI H. and UTSUMI H. Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies. *Carcinogenesis*, 2003, 24(6): 1021-1029.

YI R., QIN Y., MACARA I.G. and CULLEN B.R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, 2003, 17(24): 3011-3016.

YOMOGIDA K., OHTANI H., HARIGAE H., ITO E., NISHIMUNE Y., ENGEL J.D. and YAMAMOTO M. Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells. *Development*, 1994, 120(7): 1759-1766.

YOSHIDA H., KAWANE K., KOIKE M., MORI Y., UCHIYAMA Y. and NAGATA S. Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature*, 2005, 437(7059): 754-758.

YOUNG N.S. Hematopoietic cell destruction by immune mechanisms in acquired aplastic anemia. *Semin Hematol*, 2000, 37(1): 3-14.

YU C., NIAKAN K.K., MATSUSHITA M., STAMATOYANNOPOULOS G., ORKIN S.H. and RASKIND W.H. X-linked thrombocytopenia with thalassemia from a mutation in the amino finger of GATA-1 affecting DNA binding rather than FOG-1 interaction. *Blood*, 2002, 100(6): 2040-2045.

Z

ZERMATI Y., GARRIDO C., AMSELLEM S., FISHELSON S., BOUSCARY D., VALENSI F., VARET B., SOLARY E. and HERMINE O. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med*, 2001, 193(2): 247-254.

ZHAN M., MILLER C.P., PAPAYANNOPOULOU T., STAMATOYANNOPOULOS G. and SONG C.Z. MicroRNA expression dynamics during murine and human erythroid differentiation. *Exp Hematol*, 2007, 35(7): 1015-1025.

ZHANG P., BEHRE G., PAN J., IWAMA A., WARA-ASWAPATI N., RADOMSKA H.S., AURON P.E., TENEN D.G. and SUN Z. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(15): 8705-8710.

ZHANG P., ZHANG X., IWAMA A., YU C., SMITH K.A., MUELLER B.U., NARRAVULA S., TORBETT B.E., ORKIN S.H. and TENEN D.G. PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood*, 2000, 96(8): 2641-2648.

ZHAO H., KALOTA A., JIN S. and GEWIRTZ A.M. The c-myb proto-oncogene and microRNA-15a comprise an active autoregulatory feedback loop in human hematopoietic cells. *Blood*, 2009, 113(3): 505-516.

ZHAO W., KITIDIS C., FLEMING M.D., LODISH H.F. and GHAFFARI S. Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood*, 2006, 107(3): 907-915.

ZON L.I., TSAI S.F., BURGESS S., MATSUDAIRA P., BRUNS G.A. and ORKIN S.H. The major human erythroid DNA-binding protein (GF-1): primary sequence and localization of the gene to the X chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87(2): 668-672.

ZON L.I., YAMAGUCHI Y., YEE K., ALBEE E.A., KIMURA A., BENNETT J.C., ORKIN S.H. and ACKERMAN S.J. Expression of mRNA for the GATA-binding proteins in human eosinophils and basophils: potential role in gene transcription. *Blood*, 1993, 81(12): 3234-3241.

ANNEXES



Tumor necrosis factor alpha-mediated inhibition of erythropoiesis involves GATA-1/GATA-2 balance impairment and PU.1 over-expression

Christine Grigorakaki, Franck Morceau, Sébastien Chateauvieux, Mario Dicato, Marc Diederich *

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, 9, Rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 December 2010

Accepted 31 March 2011

Available online 9 April 2011

Keywords:

Anemia
Inflammation
TNF α
GATA-1
GATA-2
PU.1

ABSTRACT

Many physiological perturbations can cause anemia. In cancer patients, activation of the immune system leads to the production of proinflammatory cytokines including tumor necrosis factor alpha (TNF α), that have been shown to inhibit red-cell production *via* poorly understood mechanisms. Treatment of anemia by human recombinant erythropoietin (EPO) is strongly suspected to induce tumor growth.

This study focuses on the mechanisms involved in TNF α -mediated inhibition of erythropoiesis. CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) were isolated from human cord blood. Erythropoiesis was achieved *in vitro* by stimulating cells with EPO. We show that TNF α clearly affected erythroid development, as assessed by May-Grünwald/Giemsa staining, flow cytometry analysis and fluorescent microscopy. The amount of hemoglobin-producing cells as well as the expression of GATA-1 target erythro-specific genes (EPO receptor, glycophorin A and globins) was found decreased after TNF α treatment of HSPC. In correlation, TNF α induced the expression of the transcription factors GATA-2 and PU.1, described as inhibitors of erythropoiesis. In this regard, TNF α promoted the formation of the GATA-1/PU.1 complex that has been reported to block the transcriptional activity of GATA-1. Our results clearly demonstrate that TNF α prevents EPO-mediated erythropoiesis of HSPC as an early event, by directly affecting erythroid cell development.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The majority of tumors are largely infiltrated by inflammatory cells, such as myelo-monocytes and macrophages [1]. In response to the inflammatory environment, these cells produce inflammatory mediators including chemokines and cytokines. These mediators are tightly associated with cancer progression in combination with genetic alterations [2]. One of them, the tumor necrosis factor alpha (TNF α), is widely found in the inflammation-associated cancer microenvironment [3–6]. Interestingly, because TNF α is commonly present in cancer and inflammatory diseases, it has been implicated in cancer- and inflammation-related anemia. Indeed, patients suffering from cancer and chronic inflammation are often anemic [7]. Moreover, *in vitro* and *in vivo* studies have led to the conclusion that TNF α inhibits hematopoietic progenitors from undergoing erythroid differentiation [8–15]. Anti-TNF α treatment is effectively used for the treatment of chronic inflammatory diseases, but leads to increased risk of infection [16,17]. Despite the beneficial effects of anti-TNF α , this treatment may promote different types of cancers [18,19].

Several events may trigger anemia, including iron deficiency, hemolysis and hemorrhage. In non-hematopoietic cancer, anemia can also result from the activation of the immune system with the release of inflammatory cytokines that affect red-cell production in patients. So far, one well described effect of cytokine release is the reduction of erythropoietin synthesis by kidneys [20]. In this specific case, anemia is usually treated with human recombinant erythropoietin (EPO). Nevertheless, this treatment addresses only the symptoms, not the cause of the anemia. Furthermore, EPO can provoke cardiovascular and thrombo-embolic side effects, as well as possible tumor progression [21–24]. Indeed, cancer cells in many tumor types express the erythropoietin receptor (EPOR) [25], and the interaction between erythropoietin and the EPOR can activate the expression of genes implicated in angiogenesis and cell proliferation [26]. Additionally, anemic patients without erythropoietin deficiency do not respond to EPO treatment [27,28].

Erythropoiesis is a tightly regulated process by which red blood cells are generated from hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs). The development and maturation of erythroid cells requires erythropoietin, which activates several signaling pathways by acting on its specific receptor, EPOR [29,30]. These pathways are involved in cell proliferation, survival and differentiation [31–34]. Erythropoiesis is regulated by the combined action of transcription factors [35,36]. Indeed, the expression of erythroid

* Corresponding author. Tel.: +352 2468 4040, fax: +352 2468 4060.
E-mail address: marc.diederich@lbmcc.lu (M. Diederich).

specific genes is regulated by the major erythroid transcription factor, GATA-1 [37], which is involved in the terminal maturation and survival of erythroid cells. As previously shown, erythropoiesis is arrested when GATA-1 is inactivated, which leads to increased susceptibility of mouse embryos to death by anemia [38,39]. GATA-2, another member of the GATA family of transcription factors, acts as a balance to GATA-1 and is crucial during the earliest stages of erythropoiesis [40]. In addition, GATA-2 controls the self-renewal of erythroid progenitors in bone marrow [40–42]. These two factors act dynamically on hematopoietic progenitors during erythroid commitment [43,44].

GATA-1 transcriptional activity is also modulated by co-factors [37] and post-translational modifications [42]. One GATA-1 co-factor of interest is PU.1/SP1, from the Ets-family of transcription factors, that plays a critical role in the balance between myelo-monopoiesis and lymphopoiesis on the one side, and erythropoiesis on the other side [45]. Indeed, PU.1 and GATA-1 can physically interact in progenitor cells, leading to inactivation of GATA-1 and therefore the down-regulation of erythroid specific genes [46].

The mechanisms involved in TNF α -mediated inhibition of erythropoiesis are not fully understood. Our previous studies showed that TNF α inhibits erythroid differentiation of human leukemia cell lines in culture. This suggests that the cytokine can act directly on hematopoietic cells independently from erythropoietin deficiency. We reported that TNF α prevented the induction of erythroid differentiation in correlation with decreased expression of erythroid-specific genes and perturbations to the balance between GATA-1 and GATA-2 [13–15].

In the present work, we studied the effect of TNF α on the development of CD34⁺ HSPCs in the presence of EPO. In this model, different steps of erythropoiesis were successfully reproduced *in vitro*. We show that, in the heterogeneous cell population that constitutes the CD34⁺ HSPC culture, TNF α acts on EPO-treated HSPCs by perturbing erythroid development. This effect was found to correlate with changes in the key transcription factors, GATA-1, GATA-2 and PU.1. Moreover the direct effect of TNF α on erythroid progenitors has been confirmed by analyzing erythrospecific markers in isolated erythroid (GPA⁺) cells.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and treatment

Human umbilical cord blood was obtained from the Clinique Bohler in Luxembourg. For ethical reasons, cord blood cells were collected with written informed consent for use in research in agreement with the National Committee of Research Ethics in Luxembourg. The blood was collected in heparinized tubes. The mononucleated cell fraction was isolated using FicollTM (GE Healthcare, Roosendaal, The Netherlands) density gradient medium. CD34⁺ HSPCs or GPA⁺ cells were selected using magnetic cell sorting. Purification was performed following the manufacturer's instructions (MACS Miltenyi, Utrecht, The Netherlands). The average purity of the cells obtained was around 96% of CD34⁺ cells.

After isolation, the cells were cultured in serum-free culture medium for cell expansion and erythroid differentiation (Stem Cell II, Sigma–Aldrich, Bornem, Belgium), to which a cytokine cocktail containing Interleukin 3 (IL3, Reliatech, Wolfenbüttel, Germany) and stem cell factor (SCF, Reliatech) was added. Interleukin 3 (10 ng/mL) was added together with SCF (10 ng/mL) for 3 days following CD34⁺ cell enrichment. Erythroid differentiation was achieved by adding 2 U/mL human recombinant erythropoietin (EPO) (Eprex, a kind gift of Janssen-Cilag) to the medium. EPO was added on day 0, whereas IL3 was removed on day 4 and SCF was removed on day 6. The

medium was also supplemented with L-glutamine and penicillin/streptomycin (Lonza, Vervier, Belgium). The cells were maintained at 2×10^5 cells/mL. TNF α (20 ng/mL; ReliaTech) was added 1 h before EPO (Fig. S1A).

TF1 cells were provided by DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen; Braunschweig, Germany). These cells were cultured and treated as previously described [13]. All cells were kept in 5% CO₂ at 37 °C.

2.2. Assays of cell proliferation, viability, morphology and erythroid differentiation

Cell number and viability were assessed using trypan blue dye exclusion. For evaluation of cell morphology, cytospin preparations were stained with May-Grünwald/Giemsa solution (Merck, Leuven, Belgium). Benzidine staining was used to detect the pseudoperoxidase activity of hemoglobin in cells. Images were collected with a Leica DM 2000 microscope.

2.3. Flow cytometry

HSPCs (2×10^5) were washed three times in PBS, before incubation with 5 μ L of antibody for 90 min at 4 °C. FITC-labeled CD34 (clone 8G12) and CD41a (clone HIP8), PE-labeled CD11b (clone D12), CD36 (clone CB38), and CD38 (clone HB7) and PE-CyTM5-labeled GPA (235a; clone HIR2) antibodies were used (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium). The corresponding isotype control antibodies (BD Biosciences) were used to set the gating levels. The samples were fixed with 2% formaldehyde after being washed twice with $1 \times$ PBS. Analysis was performed on a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences). The statistical analysis was based on 10,000 events per sample using FlowJo[®] software (version 8.8.7, Tree Star, Ashland Oregon, USA).

2.4. Fluorescence microscopy

HSPCs (5×10^5) were washed three times in PBS. Cell pellets were then resuspended in 100 μ L of $1 \times$ PBS containing 3 μ L of GPA antibody (235a; clone HIR2; BD Biosciences) and incubated for 2 h at 4 °C. After washing three times with $1 \times$ PBS, cells were fixed with 2% formaldehyde and stained with Hoechst 33342 (1 μ g/mL; Merck, Leuven, Belgium). Five microliters of stained cells were mounted on slides and observed with an Olympus CellM fluorescent microscope (Aartselaar, Belgium).

2.5. Western blotting

Up to 4×10^6 HSPCs were used to prepare nuclear, cytoplasmic and total protein extracts, as previously described [15]. Denatured proteins (10 μ g or 20 μ g) were separated on an SDS-PAGE gel. The proteins were transferred to a PVDF membrane that was then saturated for 1 h in 5% BSA or non-fat dry milk in PBS-Tween20 (PBS-T). The membranes were probed with antibodies against GATA-1 (C20X), GATA-2 (H-116), PU.1 (T-21), EPOR (M20), α -globin, β -globin, γ -globin (Santa Cruz Biotechnology, Tebu Bio, Boechout, Belgium) and β actin (AC-15, Sigma–Aldrich). After washing with PBS-T, the membranes were incubated with peroxidase-conjugated antibodies (Santa Cruz Biotechnology). The proteins were then visualized using chemiluminescence detection (ECL, GE Healthcare) and were revealed by autoradiography. Chemiluminescence was analyzed with the Kodak image station 440 CF (Kodak, Analis, Suarlée, Belgium) and quantified with the Kodak 1D image analysis software. The fold change of relative protein expression was normalized to the internal control, β actin.

2.6. Immunoprecipitation assays

Immunoprecipitation assays were performed using MACS protein G microbeads from MACS Miltenyi. Two hundred micrograms of nuclear and cytoplasmic proteins obtained from primary hematopoietic cells were incubated with 100 μ L of protein G beads and 2 μ g of GATA-1 (C20X) antibody (Santa Cruz Biotechnology). This mixture was mixed gently overnight at 4 °C. The immune complex was immobilized in a microMACS separation column and isolated according to the manufacturer's instructions. Immunoprecipitated proteins were loaded in an SDS-PAGE electrophoresis gel followed by western blot with GATA-1 (N1) and PU.1 (T-21) antibodies (Santa Cruz Biotechnology).

2.7. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Ten micrograms of nuclear extracts from TF1 or HSPCs were incubated for 30 min on ice with [³²P]ATP-labeled oligonucleotides in a reaction mixture containing protease inhibitors, 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 5% glycerol, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 2.5 mM poly(dI-dC), 0.2 mg/mL BSA and 4 mg/mL spermidine. For supershift the nuclear extracts and labeled oligonucleotide probes were incubated with the reaction mixture for 30 min on ice prior to 30 min incubation with 2 μ g p50 (H119X) and p65 (C20X) antibodies (Santa Cruz Biotechnology). The sequence of the NF κ B probe was: sense 5'-AGTTGAGG-GACTTTCCCAGGC-3'. The corresponding binding site is underlined. Annealing and labeling was performed as described previously [15].

2.8. Real time PCR

RNA was extracted from 3×10^6 EPO-stimulated CD34⁺ cells treated with TNF α or left untreated, using Trizol (Invitrogen, Merelbeke, Belgium) and cleaned using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands). RNA quantity was measured by spectrophotometry (Nanodrop[®] ND-1000).

The RT² PCR Array First Strand Kit (SuperArray, Tebu-Bio, Boechout, Belgium) was used to synthesize cDNA from 1.5 μ g of RNA according to the manufacturer's instructions. Real time PCR was performed using a customized RT² Profiler PCR Array System kit and the primers listed in Table S1 according to the manufacturer's instructions. The samples were analyzed in a 7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems, Halle, Belgium). The results were calculated using the Δ CT method and were normalized to the GAPDH housekeeping gene.

2.9. Transient transfection assays and plasmids

TF1 cells (3.75×10^6) were electroporated using the Gene Pulser (BioRad, Nazareth, Belgium). Each pulse was made at 250 V and 950 μ F with 5 μ g of DNA in a medium added to 0.1% SVF. The reporter plasmids under the control of GATA-1 are pGL3-GATA-Luc [47] whereas the *Renilla*-expressing pHRG-TK plasmid (Promega, Leiden, The Netherlands) was used as an internal control. The pXM-GATA1 expressing vector was used to express exogenous GATA-1 in TF1 cells [48]. Twenty-four hours after transfection, the cells were seeded at 1×10^6 cell/mL and treated with 20 ng/mL of TNF α for 2 h. Dual-Glo[™] Luciferase Reagent and Dual-Glo[™] Stop&Glow Reagent (Promega) were used according to the manufacturer's instructions. Luciferase activities (Firefly and Renilla) were measured with an Orion microplate luminometer (Berthold). Firefly activity was normalized to Renilla and results were expressed as a ratio in arbitrary units.

2.10. Statistics

Data are expressed as mean \pm S.D. and were analyzed by Student's *t*-test. Results were considered statistically significant when **P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001.

3. Results

3.1. TNF α affects EPO-mediated erythroid development of CD34⁺ cells

CD34⁺ HSPCs were isolated from umbilical cord blood to an average purity of approximately 96% (Fig. 1). Following CD34⁺ isolation, cell populations were characterized by analyzing specific hematopoietic markers with flow cytometry. As expected, results show a heterogeneous population with erythro-, myelo-, megakaryo- and lymphoblastic features (Fig. 1). The cell culture procedure used to study the effect of TNF α on EPO-mediated erythropoiesis was designed as described in Fig. S1A. The culture medium was supplemented with 20 ng/mL TNF α on days 0, 4 and 6, 1 h before EPO stimulation. As shown in the control EMSA experiment, NF- κ Bp50/p65 was activated in TNF α -treated cells, indicating that CD34⁺ cells are sensitive to TNF α (Fig. S1B). Moreover, the percentage of CD34⁺ cells significantly decreased from day 4 to day 9 of treatment with EPO alone and EPO/TNF α (Fig. S1C). This suggests that cells underwent differentiation.

As shown by May-Grünwald/Giemsa staining, EPO successfully induced erythropoiesis *in vitro* (Fig. 2A). The different stages of cell maturation during erythropoiesis were observed, including reticulocyte-like cells and enucleation at days 5 and 8. TNF α treatment prevented EPO-mediated development of erythropoiesis so that the different stages of erythroblast maturation were not observed. Moreover, TNF α treatment triggered a 50% decrease in the percentage of hemoglobin producing cells (benzidine positive cells) after 4 days of treatment (Fig. 2B). Flow cytometry confirmed the effect of TNF α on the erythroid pathway. The early erythroid marker, CD36, was significantly down-regulated in TNF α -treated cells in comparison to the control EPO-treated cells on day 9. Likewise, the expression of GPA, another erythro-specific marker, was significantly decreased by 2.8-fold on day 9 of TNF α treatment (Fig. 2C). This down-regulation was also observed by fluorescent microscopy, as fluorescent intensity was lower in TNF α -treated cells (Fig. S2). Similarly, flow cytometry showed a decrease in the percentage of GPA⁺ cells after 4 and 9 days of TNF α treatment (Fig. 2C). Together, results showed that TNF α reduced both the percentage of GPA⁺ cells and the expression level of GPA in these cells. Moreover, megakaryocytic CD41a and myelo-monocytic CD11b, as well as neutrophil CD10, eosinophil CD15 and macrophage CD16 markers were not affected (data not shown). Furthermore, we observed that TNF α increased cell proliferation (Fig. 2D). Altogether, our results provide evidence that TNF α significantly prevents EPO-mediated erythroid differentiation of HSPCs in our culture system.

3.2. TNF α inhibits GATA-1 transactivation in TF1 cells

GATA-1, a key transcription factor involved in erythroid differentiation, regulates the expression of erythroid-specific genes. The ability of TNF α to inhibit GATA-1 transactivation was assessed by transient transfection assay in an established cell line to circumvent the heterogeneity of HSPC culture. The human erythroleukemia TF1 cell line was co-transfected with the pXM-GATA1 expression vector together with a reporter plasmid containing GATA sequences within the promoter upstream of the luciferase reporter gene (pGL3-GATA-Luc). After 24 h of transfection, the cells were treated with TNF α or left untreated for 2 h in medium containing granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-

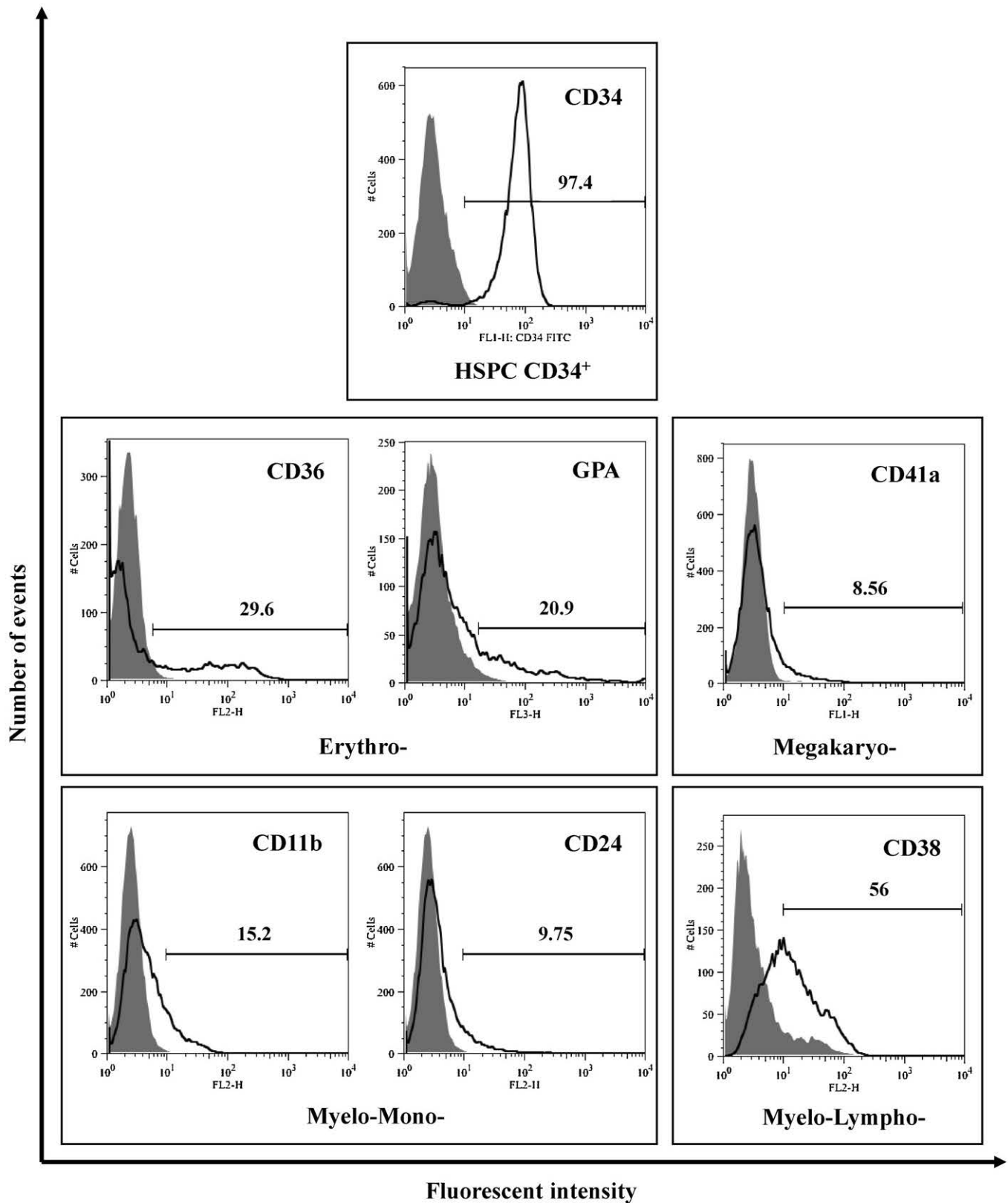
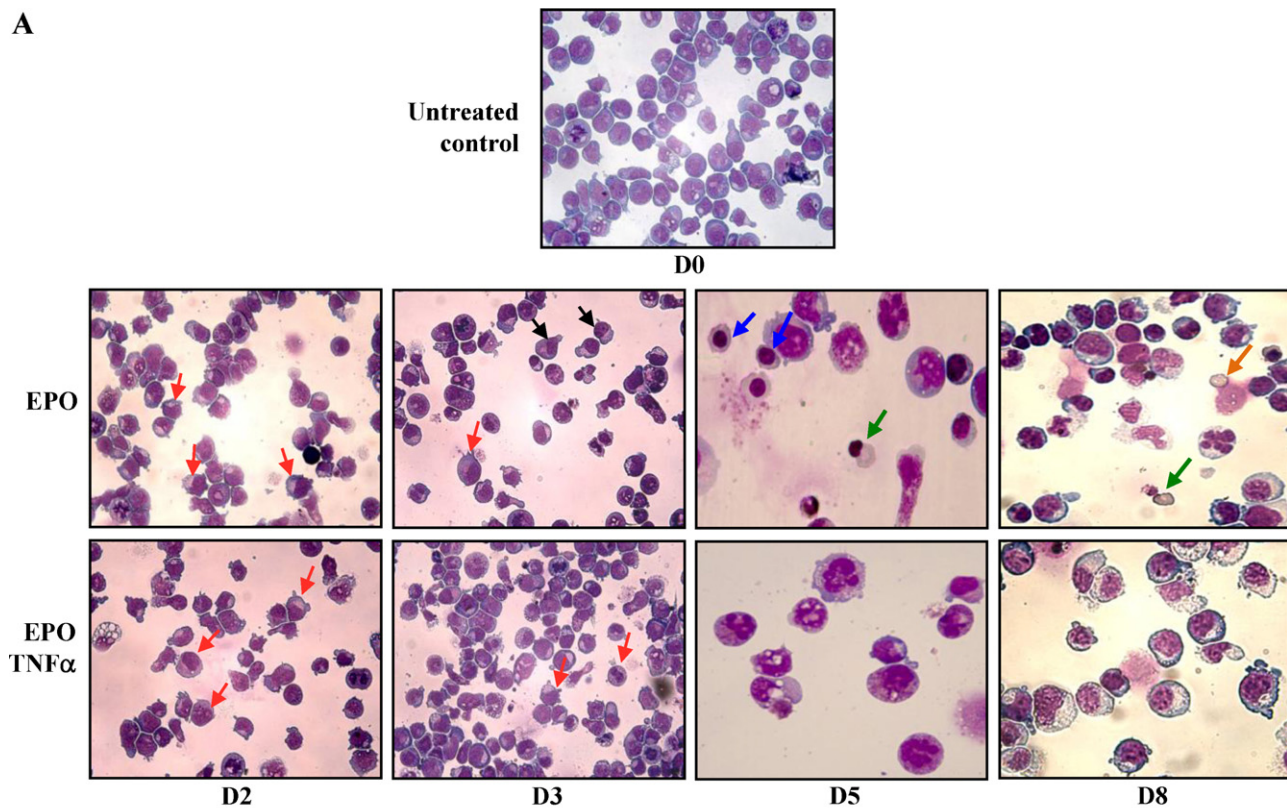


Fig. 1. Characterization of the CD34⁺ isolated population. The purity of CD34⁺ cells obtained after isolation was assessed by flow cytometry. The average purity was approximately 96%. In parallel, the presence of hematopoietic markers, such as CD36, GPA, CD41a, CD11b, CD24, and CD38 were evaluated. One representative experiment out of three is shown here.

CSF). Luciferase activity was increased 2-fold in cells transfected with pXM-GATA1. Results show that the exogenous GATA-1-mediated luciferase activation was significantly reduced in the presence of TNF α compared to basal levels, suggesting a direct effect

of the cytokine on GATA-1 transactivation (Fig. 3A). This effect may be considered to be independent from the expression level of endogenous GATA-1 in these culture conditions because GATA-1 had low basal expression in TF1 cells (Fig. 3B).

A



B

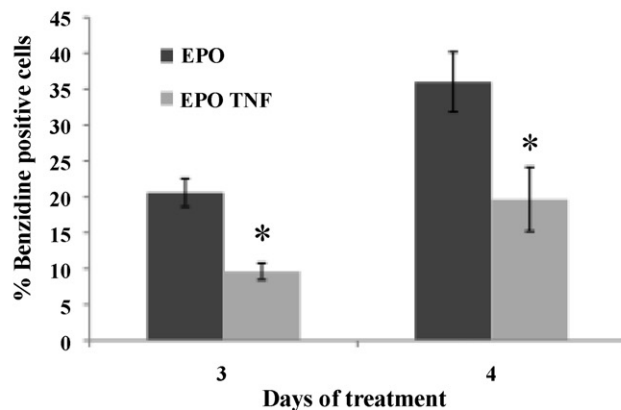


Fig. 2. *In vitro* erythropoiesis and the effect of TNF α on erythroid morphology, development and differentiation. (A) Giemsa staining at days (D) 2, 3, 5, and 8 of culture in EPO-differentiated cells treated with TNF α (20 ng/mL) or left untreated. Untreated cells from day 0 were used as a control. Red arrows: proerythroblasts; black arrows: polychromatic erythroblasts; blue arrows: orthochromatic erythroblasts; green arrows: enucleating reticulocytes; orange arrows: reticulocyte-like cells. Control, D2 and D3 images were captured using a 40 \times objective, and D5 and D8 were captured using a 100 \times objective. (B) Benzidine staining was performed on EPO-differentiated cells treated with 20 ng/mL of TNF α or left untreated for 3 and 4 days ($P < 0.05$). (C) Flow cytometry was used to evaluate the evolution of the erythroid specific markers, CD36 and GPA/CD235a, after 4 and 9 days of TNF α treatment. (D) Cell proliferation of HSPCs in the presence of EPO only or EPO/TNF α .

3.3. TNF α affects the expression of GATA-1, GATA-2 and PU.1

The effect of TNF α on GATA-1 expression, as well as other transcription factors critical for erythroid development, was then studied in EPO-differentiated HSPCs. Despite the inhibiting effect of TNF α on erythropoiesis, real-time PCR revealed a 1.5-fold increase in GATA-1 mRNA expression after 4 days of TNF α treatment. However, a 2.7-fold increase in GATA-2 and 2.3-fold increase in PU.1 were also observed after TNF α treatment (Fig. 4A). GATA-2 and PU.1 over-expression on the one hand and a perturbation of the balance between GATA-1 and GATA-2 on the other hand, are in accordance with inhibition of erythropoiesis. Moreover, GATA-2 over-expression was correlated with increased cell proliferation (Fig. 2D). Western blot analysis of the transcrip-

tion factors validated the real-time PCR results as GATA-1 expression was increased (up to 2.9-fold) in TNF α -treated HSPCs on days 2, 3 and 4. Likewise, GATA-2 and PU.1 showed a 2.8- and 2.3-fold maximal increase in expression, respectively (Fig. 4B). These results suggest that TNF α mediates its inhibiting effect by affecting transcription factors associated with GATA-1, rather than GATA-1's expression level.

3.4. Effect of TNF α on the interaction between GATA-1 and PU.1

PU.1 and GATA-1 are described as physically interacting with each other, which results in the inhibition of GATA-1 transactivation and, therefore, the down-regulation of erythroid specific genes [49]. To assess the possible capacity of TNF α to affect GATA-1

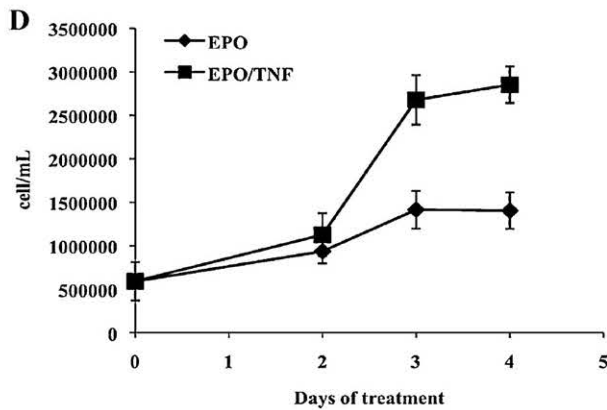
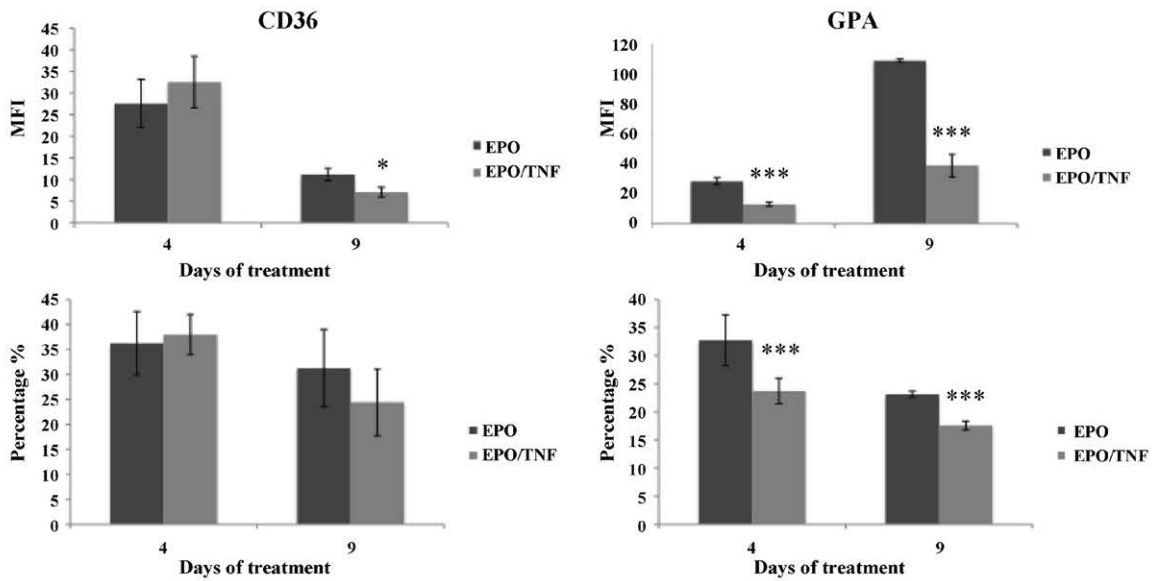
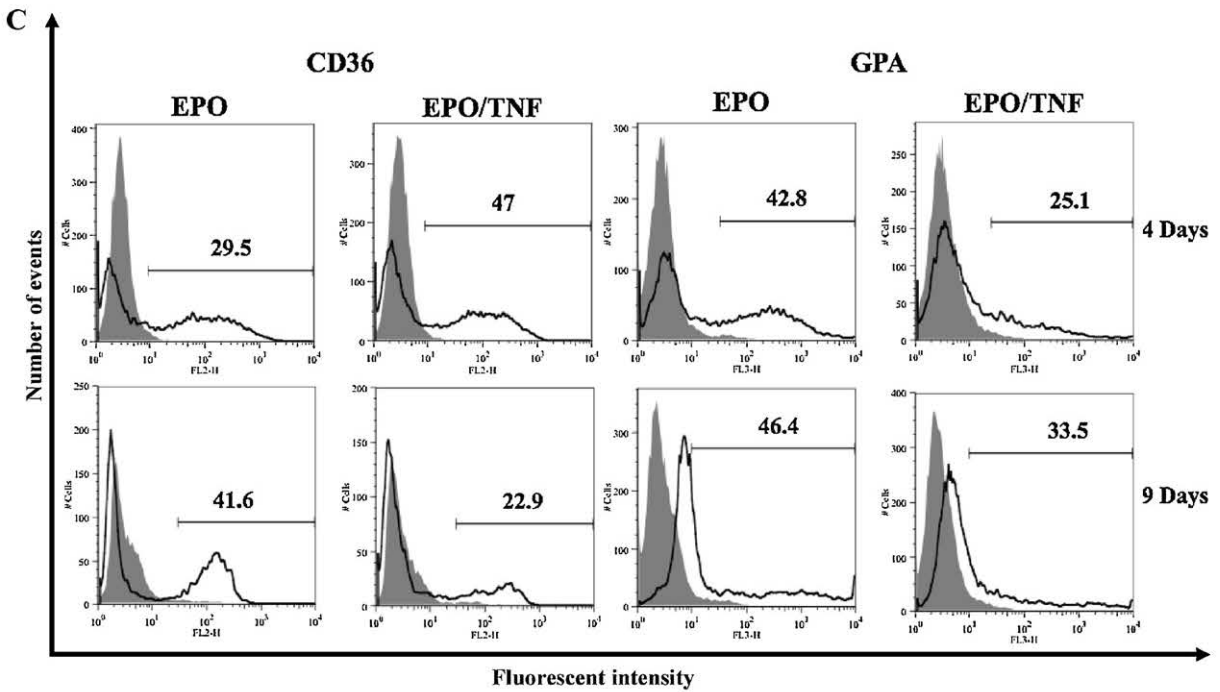


Fig. 2. (Continued).

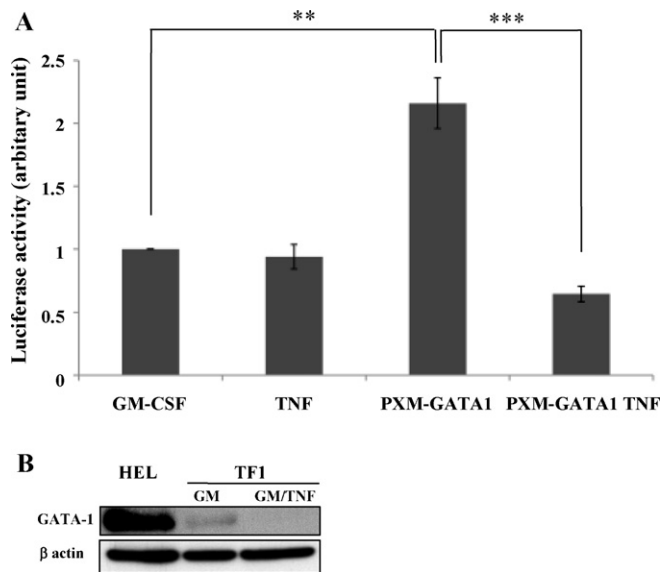


Fig. 3. Effect of TNF α on GATA-1 transcriptional activity (A) TF1 cells were co-transfected with the GATA-1-expressing vector, pXM-GATA1 and the reporter luciferase plasmids, pGL3-GATA-Luc and pHRG-TK. Transfected cells were treated for 2 h with TNF α or left untreated prior to analysis of luciferase activity. Firefly activity was normalized to Renilla, and the results are expressed as a ratio in arbitrary units. The data are presented as mean \pm S.D. of three independent experiments ($^{**}P \leq 0.01$ and $^{***}P < 0.001$). (B) GATA-1 protein expression in TF1 cells cultured in the presence of GM-CSF (GM) or GM-CSF and TNF α (GM/TNF) was assessed by western blot analysis. Nuclear extracts from human erythroleukemia HEL cells were used as a positive control. β actin was used as an internal control.

activity via PU.1 over-expression, the interaction between GATA-1 and PU.1 was studied by immunoprecipitation assay in HSPCs that had undergone EPO-mediated differentiation in the presence or absence of TNF α . The results show that PU.1 co-immunoprecipitated with GATA-1 in the nuclear protein extracts from TNF α -treated HSPCs after 4 days, whereas it did not in control cells (Fig. 4C). This result suggests that PU.1 contributes to TNF α -mediated inhibition of erythropoiesis by directly interacting with GATA-1.

3.5. TNF α down-regulates erythro-specific gene expression

To correlate the inhibiting effect of TNF α on GATA-1 activity with GATA-1 target gene expression, we analyzed glyophorin A (GPA), EPOR and globin (α , β and γ) gene expression in EPO- and EPO/TNF α -treated HSPCs at both the mRNA and protein levels. All the genes studied were found to be down-regulated in the presence of TNF α in comparison to EPO-differentiated cells that were not treated with TNF α . Real-time PCR analysis showed a 2-fold decrease in GPA, EPOR, α -globin, β -globin and γ -globin mRNA levels after 4 days of TNF α treatment. Conversely, the expression of CD11b, a monocyte/macrophage differentiation-related gene and CD41b, a megakaryocyte differentiation-related gene, were not significantly affected (Fig. 5A). Western blot analysis showed a 2-fold reduced expression of EPOR protein at days 3 and 4. Globins were not detectable or only slightly expressed after two days of TNF α treatment in comparison to EPO-stimulated cells without TNF α treatment. The expression of globins progressively increased in EPO-treated and EPO/TNF α -treated cells over the 4 days of treatment. However, α - and β -globin expression levels remained lower in the presence of TNF α . The inhibition of γ -globin observed on day 2 of TNF α treatment was abolished on days 3 and 4 (Fig. 5B). These results are in agreement with the decrease in erythroblastic cell population in culture, supporting the inhibitory effect of TNF α

on erythroid cell development via a down-regulation of GATA-1 erythro-specific target genes.

3.6. TNF α acts directly on erythroid cells

To verify the direct effect of TNF α on erythroid progenitors, HSPC were stimulated by EPO with or without TNF α treatment. Cells were treated for 9 days based on the results of flow cytometry. This result showed a more important inhibitory effect of TNF α on GPA expression level at day 9 compared to day 4 (Fig. 2C, GPA, MFI = f (days of treatment)). GPA $^{+}$ cells were isolated and Western blot analysis showed that GATA-1, GATA-2 and PU.1 expression remained over-expressed in TNF α -treated cells. Moreover, globin expression remained lower in these cells compared to EPO-stimulated cells (Fig. 6). This is in agreement with a delay of erythroid differentiation and correlates with the low expression of GPA as shown in Figs. 2C and S2. Results demonstrate that TNF α inhibits erythroid development through a direct effect on early erythroid progenitors.

4. Discussion

We used CD34 $^{+}$ HSPCs purified from umbilical cord blood, which are commonly used *in vitro* to mimic erythropoiesis, in order to investigate the effect of TNF α on erythropoiesis at the cellular and molecular levels. Cytometry revealed a heterogeneous CD34 $^{+}$ cell population detected in the culture prior to the addition of EPO or EPO/TNF α . In this study, we successfully reproduced the different steps of EPO-mediated erythropoiesis, as assessed by May-Grünwald/Giemsa staining after several days of culture. The addition of TNF α to the medium clearly repressed erythroid development of CD34 $^{+}$ cells as confirmed by several methods. In contrast, the myeloid (granulo-monocytic) and megakaryocytic pathways were not affected. This experimental model is a simplification of the *in vivo* situation since it omits other mediators of inflammation that are involved in the development of anemia [50]. Nonetheless, the action of TNF α was observed in a heterogeneous hematopoietic cell population in which anemia was successfully mimicked. Indeed, TNF α specifically inhibited erythropoiesis by acting directly on HSPCs, likely by affecting EPO activity.

At the molecular level, this study indicates the effect of TNF α on the combination of transcription factors that leads to physiological hematopoietic lineage commitment [35–37]. In erythropoiesis, the GATA-1 and GATA-2 transcription factors have essential roles, and a quantitative balance in their protein levels is required to achieve erythroid lineage development [51]. GATA-2 plays a role in early progenitor cell proliferation, and activates GATA-1 gene expression, which, conversely, silences GATA-2 expression in erythroid progenitors [52]. GATA-1 deficiency leads to death due to severe anemia [38], while GATA-2 deficiency leads to embryonic death [41]. Moreover, Ikonomi et al. reported that GATA-2 over-expression induced the arrest of erythroid differentiation in K562 cells [53]. However, it has also been reported that over-expression of GATA-1 in erythroid cells, both *in vitro*, and *in vivo*, inhibits erythroid differentiation [54,55]. In our *in vitro* culture system, GATA-1, and GATA-2 were both over-expressed, suggesting a deregulation of the balance between GATA-1 and GATA-2 after TNF α treatment. The increase in GATA-2 expression could explain the over-expression of GATA-1 [43]. However, we previously reported increased expression of GATA-2 in combination with decreased expression of GATA-1 in EPO-induced TF1 cells in the presence of TNF α [13]. Observations were then in favor of a role for GATA-2 over-expression in the effect of TNF α on HSPCs. However, GATA-2 up-regulation by TNF α has also been described in the hepatocarcinoma cell line (HepG2) [56]. This

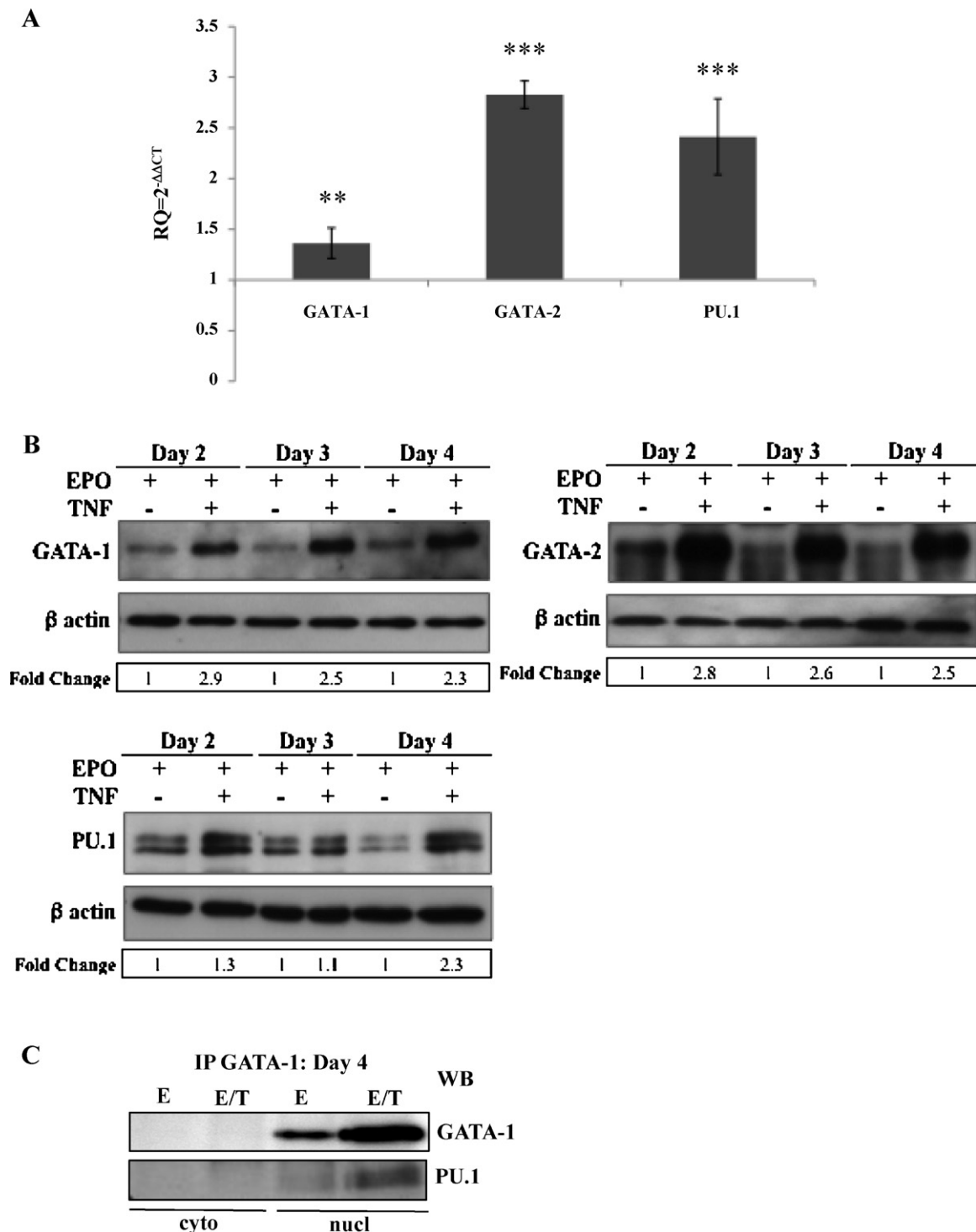


Fig. 4. Effect of TNF α on erythroid-specific transcription factors. (A) EPO-differentiated cells were treated with TNF α or left untreated for 4 days. Total RNA was extracted and subjected to reverse transcription and real-time PCR. Results were calculated by Δ CT method and normalized to the housekeeping gene, GAPDH. (B) EPO-differentiated cells were treated with TNF α or left untreated, and nuclear factors were extracted on days 2, 3 and 4. GATA-1, GATA-2 and PU.1 expression were analyzed by western blot. β actin was used as an internal control. One experiment out of three independent experiments is shown. (C) EPO-stimulated CD34⁺ cells were treated with TNF α or left untreated for 4 days. Nuclear (nucl) and cytoplasmic (cyto) proteins were extracted and GATA-1 was immunoprecipitated using GATA-1 (C20X) antibody. GATA-1 (N1) and PU.1 (T-21) antibodies were then used to reveal GATA-1 and PU.1 by immunoblotting. One out of three independent experiments is shown.

effect was involved in the inhibition of erythropoietin gene expression at the level of the kidney and liver, which could represent an alternate mechanism by which pro-inflammatory cytokines trigger anemia. Here, we provide evidence that TNF α can also inhibit erythropoiesis by directly affecting EPO-responsive HSPC erythroid differentiation.

To evaluate the effect of TNF α on GATA-1 transcriptional activity, exogenous GATA-1 was transiently transfected together with the pGL3-GATA-Luc reporter plasmid in TF1 cells. The use of this cell line circumvented the heterogeneity of HSPC culture and the activation of the GATA responsive element within the reporter gene promoter by other members of the GATA family of

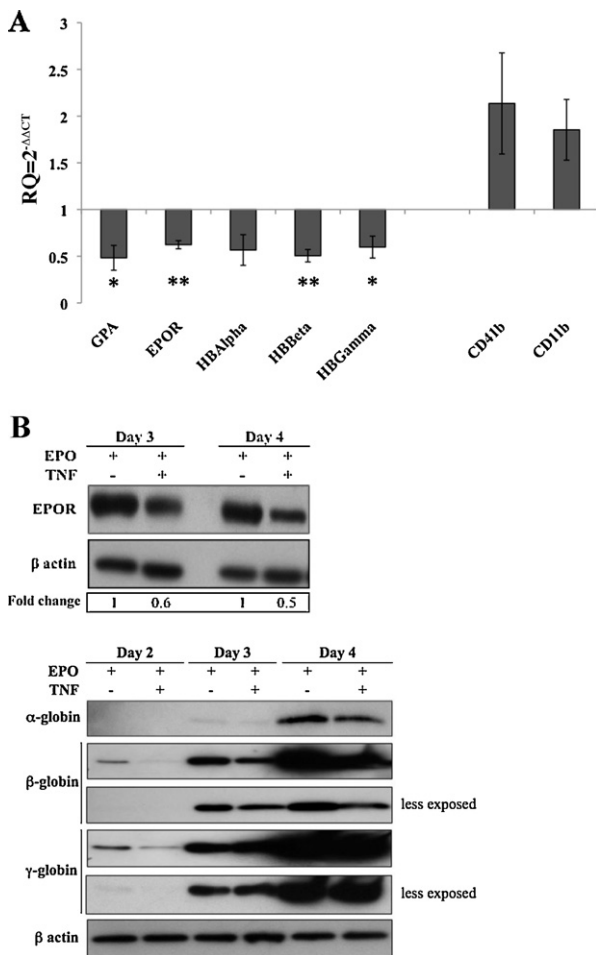


Fig. 5. Effect of TNF α on erythroid-specific gene expression. (A) EPO-stimulated CD34⁺ cells were treated with TNF α or left untreated for 4 days. Total RNA was extracted and submitted to reverse transcription and real-time PCR using specific primers for GPA (glycophorin A), EPOR (erythropoietin receptor), HB (hemoglobin), CD41b and CD11b genes. Δ CT values were calculated and normalized to the GAPDH housekeeping gene (*P values < 0.05; $^{**}P$ values < 0.01). (B) Western blot analysis of α -globin, β -globin, γ -globin and EPOR in total protein extracts from CD34⁺ cells treated with TNF α or left untreated for 2, 3 and 4 days. β actin was used as an internal control. One out of three independent experiments is shown.

transcription factors, including endogenous GATA-1 itself. Indeed, GATA-1 expression remains at a very low basal level in TF1 cells when cultured in GM-CSF containing medium. In the presence of TNF α , the transcriptional activity of GATA-1 was significantly reduced, such that the inhibiting effect was attributed to a direct alteration of GATA-1 transactivation by TNF α . This effect could involve impairments in the posttranslational regulation of GATA-1, as we previously showed that TNF α reduced GATA-1 acetylation in TF1 cells [13].

Moreover, GATA-1 activity is also dependent on interaction with co-factors. It has been reported that PU.1 inhibits erythroid differentiation by physically interacting with GATA-1 and inhibiting its binding to the DNA of erythro-specific genes [46,49,57]. We show in this study that TNF α induced increased expression of the myeloid and lymphoid transcription factor, PU.1 [58,59]. The analysis of GATA-1/PU.1 interaction by immunoprecipitation showed that the TNF α -mediated increase in PU.1 expression was associated with the formation of the GATA-1/PU.1 complex in the nuclear extracts from EPO-induced HSPCs. These results support a critical role for PU.1 in TNF α -mediated inhibition of erythropoiesis, likely by affecting GATA-1 activity in HSPCs. In

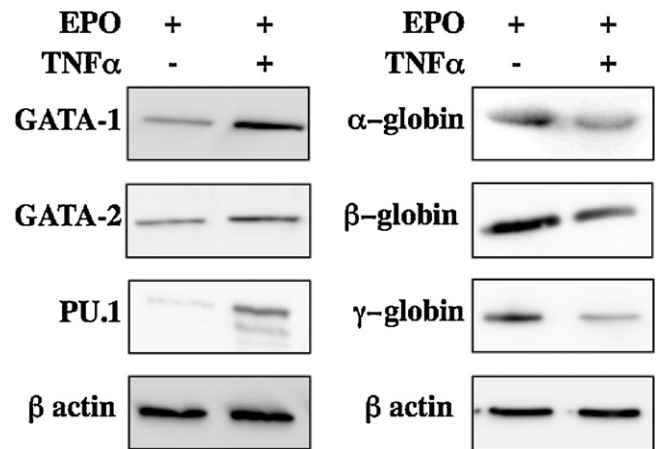


Fig. 6. Effect of TNF α on isolated GPA⁺ cells. HSPC cells were treated with TNF α or left untreated for 9 days. GPA⁺ cells were then isolated and the nuclear and cytoplasmic protein extracts were used to perform western blot analysis of the transcription factors GATA-1, GATA-2 and PU.1 and the α -, β - and γ -globin. β actin was used as an internal control. One out of three independent experiments is shown.

correlation with this proposal, TNF α -mediated inhibition of erythropoiesis was associated with the down-regulation of only GATA-1 target genes. Furthermore, persistent over-expression of GATA-2 is in accordance with the decreased activity of GATA-1, as GATA-2 has been reported to be up-regulated in the absence of GATA-1 [60]. However, over-expression of GATA-2 might contribute to progenitor renewal.

Altogether, our results indicate that TNF α affects distinct regulatory steps that are implicated in erythroid maturation and differentiation. We show that TNF α plays a critical role in the impairment of the balance between GATA-1 and GATA-2. Moreover, we provide, for the first time, the evidence that TNF α induces PU.1 protein over-expression in HSPCs and perturbs the normal pattern of erythroid-implicated factors, thus promoting deregulation of lineage commitment despite the presence of EPO. Furthermore, the analysis of globin and transcription factor expression in GPA⁺ erythroid cells after TNF α treatment of HSPCs supported the hypothesis of a direct effect of TNF α on erythroid progenitors.

Therefore, we suggest that cancer-related anemia results in part, from a direct interaction between HSPCs and pro-inflammatory cytokines released in the bone marrow and tumor microenvironment. According to our results this interaction triggers modifications in specific transcription factor networks implicated in the regulation of the different lineages commitment. While EPO is efficient for treating anemia associated with erythropoietin deficiency, alternative therapies are obviously required in the case of direct TNF α -mediated injury of erythroid development in the presence of functional erythropoietin.

Acknowledgements

The authors thank E. Henry for technical assistance, C. Groos for helpful comments and the staff of the Clinique Bohler for collecting cord blood. This work was supported by Télévie, the Fondation de Recherche "Cancer et Sang" and "Recherches Scientifiques Luxembourg" asbl. CG was supported by an Aide Formation Recherche (AFR) grant of the Fonds National de la Recherche (FNR), Luxembourg. The authors thank the "Een Häerz fir Kriibskrank Kanner" asbl and the Action Lions "Vaincre le Cancer" for additional support. Print and editing costs were covered by the Fonds National de la Recherche (FNR), Luxembourg.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bcp.2011.03.030.

References

- [1] Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* 2007;117:1155–66.
- [2] Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454:436–44.
- [3] Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004;431:461–6.
- [4] Friess H, Guo XZ, Nan BC, Kleeff O, Buchler MW. Growth factors and cytokines in pancreatic carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1999;880:110–21.
- [5] Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004;4:540–50.
- [6] Moore RJ, Owens DM, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N, et al. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med* 1999;5:828–31.
- [7] Knight K, Wade S, Balducci L. Prevalence and outcomes of anemia in cancer: a systematic review of the literature. *Am J Med* 2004;115–265. 116 Suppl 7A:.
- [8] Johnson RA, Waddelow TA, Caro J, Olliff A, Roodman GD. Chronic exposure to tumor necrosis factor in vivo preferentially inhibits erythropoiesis in nude mice. *Blood* 1989;74:130–8.
- [9] Papadakis HA, Kritikos HD, Valatas V, Boumpas DT, Eliopoulos GD. Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis is associated with increased apoptosis of bone marrow erythroid cells: improvement following anti-tumor necrosis factor-alpha antibody therapy. *Blood* 2002;100:474–82.
- [10] Xiao W, Koizumi K, Nishio M, Endo T, Osawa M, Fujimoto K, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits generation of glycophorin A+ cells by CD34+ cells. *Exp Hematol* 2002;30:1238–47.
- [11] Dufour C, Corcione A, Svahn J, Haupt R, Poggi V, Beka'ssy AN, et al. TNF-alpha and IFN-gamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis in vitro. *Blood* 2003;102:2053–9.
- [12] Dubej S, Shukla P, Nityanand S. Expression of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in bone marrow T cells and their levels in bone marrow plasma in patients with aplastic anemia. *Ann Hematol* 2005;84:572–7.
- [13] Buck I, Morceau F, Cristofanon S, Heintz C, Chateauvieux S, Reuter S, et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits erythroid differentiation in human erythropoietin-dependent cells involving p38 MAPK pathway GATA-1 and FOG-1 downregulation and GATA-2 upregulation. *Biochem Pharmacol* 2008;76:1229–39.
- [14] Buck I, Morceau F, Cristofanon S, Reuter S, Dicato M, Diederich M. The inhibitory effect of the proinflammatory cytokine TNFalpha on erythroid differentiation involves erythroid transcription factor modulation. *Int J Oncol* 2009;34:853–60.
- [15] Morceau F, Schnekenburger M, Blasius R, Buck I, Dicato M, Diederich M. Tumor necrosis factor alpha inhibits acclacinomycin A-induced erythroid differentiation of K562 cells via GATA-1. *Cancer Lett* 2006;240:203–12.
- [16] Haraoui B. Differentiating the efficacy of tumor necrosis factor inhibitors. *J Rheumatol Suppl* 2005;74:3–7.
- [17] Vilcek J, Feldmann M. Historical review: cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:201–9.
- [18] Yan L, Anderson GM, DeWitte M, Nakada MT. Therapeutic potential of cytokine and chemokine antagonists in cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006;42:793–802.
- [19] Scheinfeld N. A comprehensive review and evaluation of the side effects of the tumor necrosis factor alpha blockers etanercept, infliximab and adalimumab. *J Dermatol Treat* 2004;15:280–94.
- [20] Spivak JL. The anaemia of cancer: death by a thousand cuts. *Nat Rev Cancer* 2005;5:543–55.
- [21] Engert A. Recombinant human erythropoietin in oncology: current status and further developments. *Ann Oncol* 2005;16:1584–95.
- [22] Rizzo JD, Somerfield MR, Hagerty KL, Seidenfeld J, Bohlius J, Bennett CL, et al. Use of epoetin and darbepoetin in patients with cancer: 2007 American Society of Hematology/American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *Blood* 2008;111:25–41.
- [23] Bohlius J, Schmidlin K, Brillant C, Schwarzer G, Trelle S, Seidenfeld J, et al. Recombinant human erythropoiesis-stimulating agents and mortality in patients with cancer: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2009;373:1532–42.
- [24] Tonelli M, Hemmelgarn B, Reiman T, Manns B, Reaume MN, Lloyd A, et al. Benefits and harms of erythropoiesis-stimulating agents for anemia related to cancer: a meta-analysis. *CMAJ* 2009;180:E62–71.
- [25] Fandrey J. Erythropoietin receptors on tumor cells: what do they mean? *Oncologist* 2008;13(Suppl. 3):16–20.
- [26] Yasuda Y, Fujita Y, Matsuo T, Koinuma S, Hara S, Tazaki A, et al. Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies. *Carcinogenesis* 2003;24:1021–9.
- [27] Cooper AC, Mikhail A, Lethbridge MW, Kemeny DM, Macdougall IC. Increased expression of erythropoiesis inhibiting cytokines (IFN-gamma, TNF-alpha IL-10, and IL-13) by T cells in patients exhibiting a poor response to erythropoietin therapy. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1776–84.
- [28] Macdougall IC, Cooper AC. Hyporesponsiveness to erythropoietic therapy due to chronic inflammation. *Eur J Clin Invest* 2005;35Suppl3:32–5.
- [29] Tan CC, Eckardt KU, Firth JD, Ratcliffe PJ. Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am J Physiol* 1992;263:F474–81.
- [30] Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1993;74:227–36.
- [31] Socolovsky M, Nam H, Fleming MD, Haase VH, Brugnara C, Lodish HF. Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* 2001;98:3261–73.
- [32] Bouscary D, Pene F, Claessens YE, Muller O, Chretien S, Fontenay-Roupie M, et al. Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood* 2003;101:3436–43.
- [33] Myklebust JH, Blomhoff HK, Rusten LS, Stokke T, Smeland EB. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 2002;30:990–1000.
- [34] Carroll MP, Spivak JL, McMahon M, Weich N, Rapp UR, May WS. Erythropoietin induces Raf-1 activation and Raf-1 is required for erythropoietin-mediated proliferation. *J Biol Chem* 1991;266:14964–9.
- [35] Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 2008;132:631–44.
- [36] Friedman AD. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 2007;26:6816–28.
- [37] Morceau F, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M. GATA-1: friends brothers coworkers. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1030:537–54.
- [38] Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V, et al. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 1991;349:257–60.
- [39] Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:12355–8.
- [40] Tsai FY, Orkin SH. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* 1997;89:3636–43.
- [41] Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 1994;371:221–6.
- [42] Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 2005;25:1215–27.
- [43] Ohneda K, Yamamoto M. Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. *Acta Haematol* 2002;108:237–45.
- [44] Leonard M, Brice M, Engel JD, Papayannopoulou T. Dynamics of GATA transcription factor expression during erythroid differentiation. *Blood* 1993;82:1071–9.
- [45] Tenen DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 2003;3:89–101.
- [46] Zhang P, Zhang X, Iwama A, Yu C, Smith KA, Mueller BU, et al. PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood* 2000;96:2641–8.
- [47] Blobel GA, Nakajima T, Eckner R, Montminy M, Orkin SH. CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2061–6.
- [48] Collavin L, Gostissa M, Avolio F, Secco P, Ronchi A, Santoro C, et al. Modification of the erythroid transcription factor GATA-1 by SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:8870–5.
- [49] Liew CK, Simpson RJ, Kwan AH, Crofts LA, Loughlin FE, Matthews JM, et al. Zinc fingers as protein recognition motifs: structural basis for the GATA-1/friend of GATA interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:583–8.
- [50] Buck I, Morceau F, Grigorakaki C, Dicato M, Diederich M. Linking anemia to inflammation and cancer: the crucial role of TNFalpha. *Biochem Pharmacol* 2009;77:1572–9.
- [51] Ferreira R, Wai A, Shimizu R, Gillemans N, Rottier R, von Lindern M, et al. Dynamic regulation of Gata factor levels is more important than their identity. *Blood* 2007;109:5481–90.
- [52] Grass JA, Boyer ME, Pal S, Wu J, Weiss MJ, Bresnick EH. GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8811–6.
- [53] Ikonomi P, Rivera CE, Riordan M, Washington G, Schechter AN, Noguchi CT. Overexpression of GATA-2 inhibits erythroid and promotes megakaryocyte differentiation. *Exp Hematol* 2000;28:1423–31.
- [54] Whyatt D, Lindeboom F, Karis A, Ferreira R, Milot E, Hendriks R, et al. An intrinsic cell-nonautonomous defect in GATA-1-overexpressing mouse erythroid cells. *Nature* 2000;406:519–24.
- [55] Whyatt DJ, Karis A, Harkes IC, Verkerk A, Gillemans N, Elefanty AG, et al. The level of the tissue-specific factor GATA-1 affects the cell-cycle machinery. *Genes Funct* 1997;1:11–24.
- [56] La Ferla K, Reimann C, Jellmann W, Helliwig-Burgel T. Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-kappaB. *FASEB J* 2002;16:1811–3.

- [57] Stopka T, Amanatullah DF, Papetti M, Skoultchi AI. PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure. *EMBO J* 2005;24:3712–23.
- [58] DeKoter RP, Singh H. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 2000;288:1439–41.
- [59] Ito T, Nishiyama C, Nishiyama M, Matsuda H, Maeda K, Akizawa Y, et al. Mast cells acquire monocyte-specific gene expression and monocyte-like morphology by overproduction of PU.1. *J Immunol* 2005;174:376–83.
- [60] Weiss MJ, Keller G, Orkin SH. Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev* 1994;8:1184–97.

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm

Commentary

Linking anemia to inflammation and cancer: The crucial role of TNF α

Isabelle Buck, Franck Morceau, Christina Grigorakaki, Mario Dicato, Marc Diederich *

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

ARTICLE INFO

Keywords:

TNF α
Erythropoietin
Erythroid differentiation
Inflammation
Cancer

ABSTRACT

Erythropoiesis is considered as a multistep and tightly regulated process under the control of a series of cytokines including erythropoietin (Epo). Epo activates specific signaling pathways and leads to activation of key transcription factors such as GATA-1, in order to ensure erythroid differentiation. Deregulation leads to a decreased number of red blood cells, a hemoglobin deficiency, thus a limited oxygen-carrying capacity in the blood. Anemia represents a frequent complication in various diseases such as cancer or inflammatory diseases. It reduces both quality of life and prognosis in patients. Tumor necrosis factor alpha (TNF α) was described to be involved in the pathogenesis of inflammation and cancer related anemia. Blood transfusions and erythroid stimulating agents (ESAs) including human recombinant Epo (rhuEpo) are currently used as efficient treatments. Moreover, the recently described conflicting effects of ESAs in distinct studies require further investigations on the molecular mechanisms involved in TNF α -caused anemia. The present study aims to evaluate the current knowledge and the importance of the effect of the proinflammatory cytokine TNF α on erythropoiesis in inflammatory and malignant conditions.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The proinflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF α) was brought in connection with inflammation and cancer, two tightly linked research areas [1–3] and it was demonstrated that cancer-associated inflammation could promote tumor growth [1,4,5]. TNF α expression has been confirmed in the tumor microenvironment of various malignancies [6] and was categorized as a tumor promoter because of its effects on

tumor initiation and progression [7,8]. Furthermore there are more and more drugs in clinical development that modulate TNF α function in a wide range of inflammatory diseases and cancers [8].

Cancer and inflammation related anemia were shown to be mediated by cytokine release, and particularly by TNF α , interferon- β (IFN- β), and interleukin-1 (IL-1) [9]. Moreover, inhibition of colony-forming units-erythroid (CFU-E) in uremic patients with inflammatory disease due to TNF α and IFN- γ

* Corresponding author. Tel.: +352 2468 4040; fax: +352 2468 4060.

E-mail address: marc.diederich@lbmcc.lu (M. Diederich).

Abbreviations: Epo, erythropoietin; NF- κ B, nuclear factor-kappa B; FOG-1, friend of GATA; NF-E2, nuclear factor erythroid 2; EKLK, erythroid krüppel like factor; SCF, stem cell factor; EpoR, epo receptor; HIF, hypoxia inducible factor; HSC, hematopoietic stem cell factor; BFU-E, burst-forming unit-erythroid; CFU-E, colony-forming unit-erythroid; FA, fanconi anemia; GPA, glycoprotein A; TNF α , tumor necrosis factor alpha; TNFR, TNF α receptor; ESA, erythroid stimulating agent.

0006-2952/\$ – see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.bcp.2008.12.018

release has been reported [10]. Following anti-TNF α therapy, patients with rheumatoid arthritis showed improvement in anemic symptoms [11]. Since several years, human recombinant erythropoietin (rhuEpo) is a specific remedy administered against cancer-associated anemia. This treatment has a positive impact on hemoglobin levels and patient quality of life is improved. However, a preclinical background and some clinical data suggest a detrimental role of Epo in cancer by a possible stimulation of tumor growth.

2. Regulation of erythropoiesis

Hematopoiesis is the physiological process that leads to the formation of circulating blood cells from common hematopoietic stem cells (HSCs) in the bone marrow. The different mature hematopoietic cells are usually classified in lymphoid and myeloid lineages. They are regulated by distinct cytokines acting on multipotential progenitors and their committed offspring [12,13] (Fig. 1).

Erythropoiesis is a multistep event leading to the formation of erythrocytes. Erythroid differentiation arises from the myeloid root and is phenotypically characterized by the production of hemoglobin and expression of erythroid markers (Fig. 2). During differentiation from a multipotent common myeloid progenitor (CMP) to a bipotent megakaryocytic/erythroid progenitor (MEP), burst-forming units-erythroid (BFU-E) and CFU-E are the earliest identifiable erythroid progenitors in culture (Fig. 1). BFU-E and CFU-E are characterized by their *in vitro* ability to form colonies.

Erythropoiesis is a very dynamic and tightly regulated process by which 2×10^{11} erythrocytes (lifespan of 100–120 days) are produced every day. Ferrous iron (Fe^{2+}) is essential for erythropoiesis as a major component of heme in hemoglobin as well as in the redox system of the respiratory chain. Heparin, a 25-amino acid peptide, is the main regulator of iron transport. A feedback loop involving the major cytokine for human erythropoiesis, Epo, regulates this physiological process, but other cytokines and nuclear hormones are also involved. IL-3 increases the number of BFU-E, whereas stem

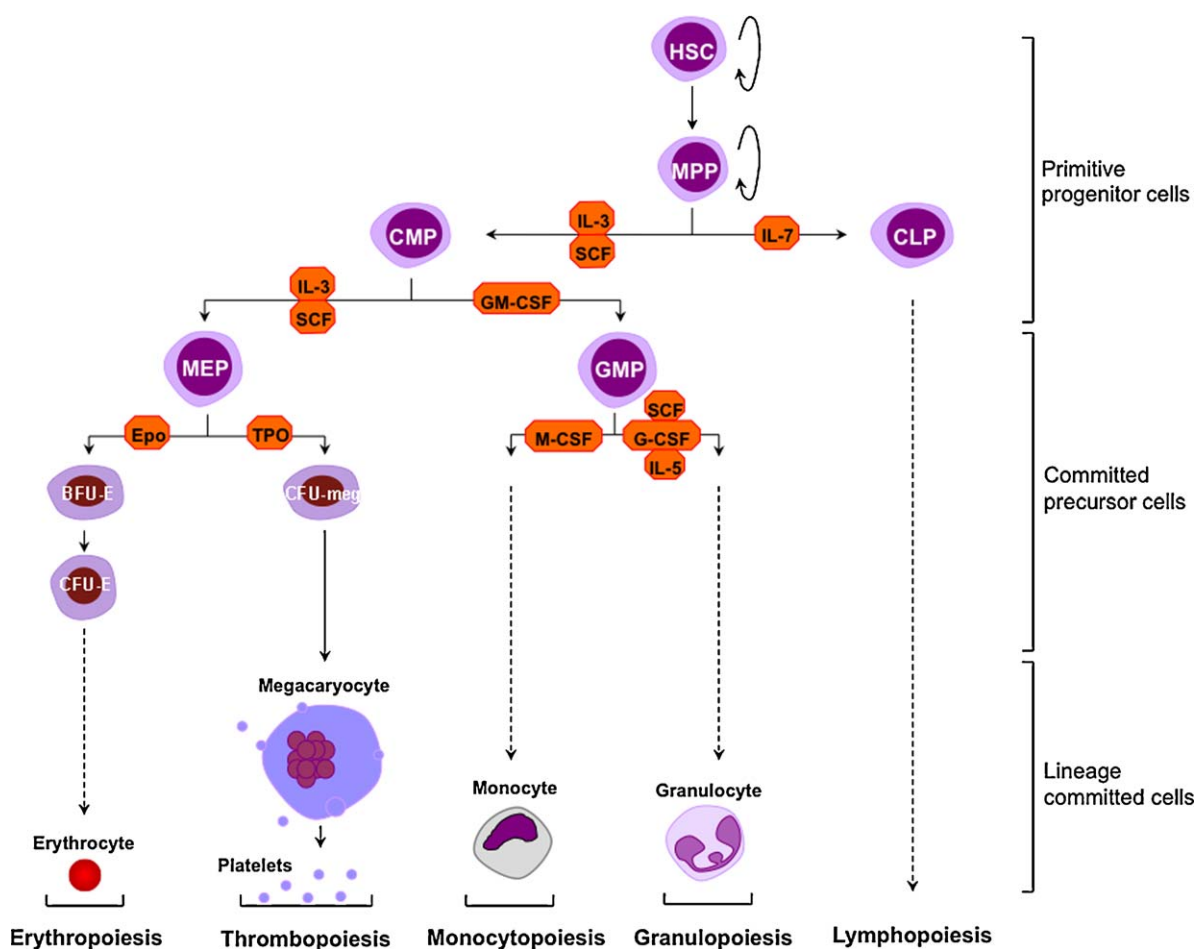


Fig. 1 – Hematopoiesis and the role of cytokines. Cytokines act both on multipotential progenitors and their committed offspring. CLP, common lymphoid progenitor; CMP, common myeloid progenitor; HSC, hematopoietic stem cell; GMP, granulocyte-macrophage progenitor; MEP, megakaryocyte erythroid progenitor; BFU-E, burst-forming units-erythroid; CFU-E, colony-forming units-erythroid; CFU-Meg, colony-forming units-megakaryocyte; MPP, multipotent progenitor; IL, interleukin; SCF, stem cell factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; M-CSF, macrophage colony stimulating factor; TPO, thrombopoietin; Epo, erythropoietin (adapted from Refs. [12,13] with modifications).

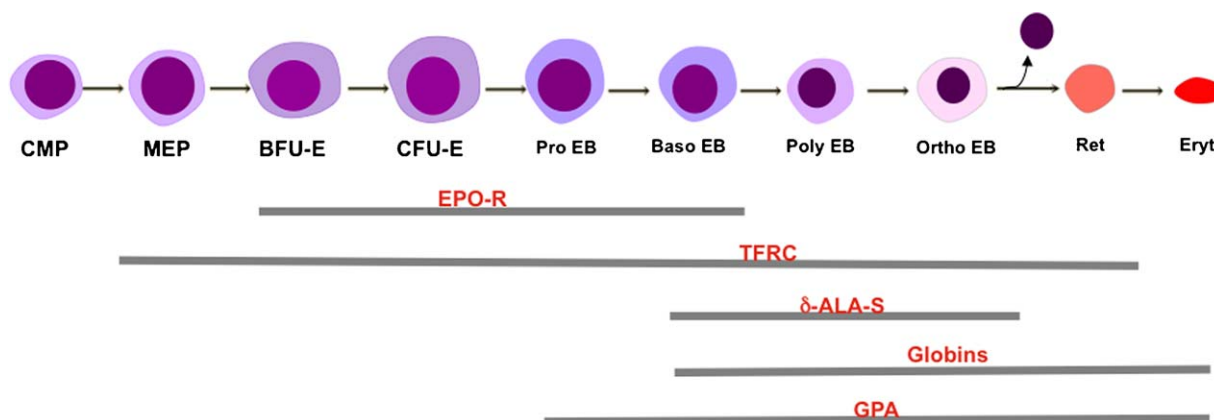


Fig. 2 – Stages of mammalian erythropoiesis and corresponding expression of erythroid specific markers. The relative sizes and morphologic appearances of erythroid cells at various stages of differentiation: common myeloid progenitor (CMP), megakaryocyte erythroid progenitor (MEP), burst-forming units-erythroid (BFU-E), colony-forming units-erythroid (CFU-E), proerythroblasts (Pro EB), basophilic erythroblasts (Baso EB), polychromatophilic erythroblasts (Poly EB), orthochromatic erythroblasts (Ortho EB), reticulocytes (RET), and erythrocytes (Eryt). Erythroid markers are represented in red and their periods of expression with gray lines: erythropoietin receptor (EpoR), glyophorin A (GPA), transferrin receptors (TFRCs), δ -aminolevulinic synthase (δ -ALA-S) (adapted from Ref. [81]).

cell factor (SCF) raises the number of cells within BFU-E and CFU-E (Fig. 1).

Kidney and liver are the main sites that produce the Epo in adult humans. The rate of Epo gene expression depends on the level of tissue oxygen through the availability of the hypoxia inducible factor (HIF). HIF heterodimer is composed of the oxygen sensitive HIF-1 α and the constitutively expressed HIF-1 β subunits. In hypoxic conditions HIF interacts with specific binding sites in the Epo enhancer. Oxygen-dependent prolyl hydroxylases control Epo variations in the kidney by regulating the stability of HIF-1 α . The number of circulating erythrocytes is directly dependent on Epo amount in blood.

Epo is implicated in the control of cell survival, proliferation and differentiation within the erythroid pathway. It acts through its receptor (EpoR) in order to stimulate underlying cell signaling pathways including the Phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), the Janus kinase (JNK)/signal-transducer and activator of transcription (STAT) and the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-related kinase (ERK) pathways [14]. Moreover, Epo has been reported to modulate GATA-1 function in erythroid cells [15].

The survival of erythroid precursors and their terminal differentiation into red blood cells depends on Epo/EpoR interaction and GATA-1 transcription factor activity. GATA-1 was first identified as a protein with binding capacity to the β -globin promoter [16]. It is a member of the GATA family, which includes 6 members (GATA-1 to GATA-6). These transcription factors recognize the same DNA consensus sequence (A/T)GATA(A/G) and present two characteristic zinc finger motifs specific to the GATA family [17]. Three functional domains compose GATA-1 protein: the N-terminal Zinc finger that supplies the stabilization and specificity of DNA-binding and is responsible for the interactions with cofactors, the C-terminal Zinc finger that is essential for binding to the GATA consensus sequence of the DNA and the N-terminal activation domain [18].

GATA-1 is required for terminal erythroid maturation [19]. Indeed, its crucial role in erythropoiesis was shown using GATA-1 null mouse embryos, which died between E10.5 and E12.5 from severe anemia due to a complete ablation of embryonic erythropoiesis [20]. Moreover, GATA-1 $^{-/-}$ embryonic stem cells cannot contribute to definitive erythropoiesis [21].

GATA-1 activity is dependent on protein–protein interactions, involving cofactors with either promoting or repressing activities [18] (Table 1). The transcription factor PU.1, an Ets family member of transcription factors, is required for the development of the myeloid and lymphoid lineages. Nevertheless, its inhibitory effect on GATA-1 activity can prevent erythroid differentiation. PU.1 and GATA-1 have a cross-antagonistic relationship. Indeed, GATA-1 and PU.1 seem to functionally antagonize each other via direct physical interaction of their DNA-binding domains. PU.1 impairs GATA-1 by inhibiting its binding to DNA while GATA-1 inhibits PU.1 by preventing its interaction with c-Jun [22].

Table 1 – The main transcription factors and cofactors involved in the regulation of erythroid specific genes expression and their positive (+) or negative (–) effect on erythropoiesis.

Factor name	Effect	References
GATA-1	+	[20]
GATA-2	+/-	[82]
NF-E2 (nuclear factor erythroid 2)	+	[83]
FOG (friend of GATA)-1	+	[84]
Lmo2 (LIM-only protein 2) (Rbtl2)	+	[85]
p300/CBP	+	[86]
EKLF (erythroid kruppel like factor)	+	[87]
PU.1 (SPI1)	–	[22]
c-Myb	–	[88]

In summary, GATA-1 activity is dependent on complex positive and negative interactions with transcriptional cofactors as well as posttranslational modifications leading to modulation of erythroid lineage-specific genes transcription.

GATA-2, nuclear factor erythroid-2 (NF-E2) and erythroid Krüppel-like factor (EKLF) are other specific transcription factors that have a major influence on erythroid differentiation and that are activated during erythropoiesis. GATA-2 is overexpressed during early hematopoiesis resulting in maintenance of the renewal capacity of erythroid progenitor cells. Its expression is then progressively repressed by the increasing expression of GATA-1 [23]. NF-E2 is described to act as a major regulator of hemoglobin synthesis during erythropoiesis [24], and EKLF, as a crucial factor in erythroid and megakaryocytic differentiation and maturation [25,26] (Table 1).

Deregulation of Epo or other key factors of erythroid differentiation can lead to major changes in red blood cell number, and subsequent decrease in the oxygen-carrying capacity of the blood. Erythrocytosis are disorders resulting in an excessively high level of erythrocytes, whereas anemia is characterized by a qualitative or quantitative deficiency of hemoglobin. Anemia is clinically defined by a hemoglobin (Hb) level inferior to 12 g/dL.

3. Tumor necrosis factor alpha

TNF α also known as cachectin or differentiation inducing factor (DIF), is a proinflammatory multifunctional cytokine, which is mainly produced by macrophages, but also by neutrophils, fibroblasts, keratinocytes, astrocytes, Kupffer cells, smooth-muscle cells, T and B cells. It was initially described to induce hemorrhagic necrosis in transplanted tumors [27]. TNF α effects are principally mediated through two distinct receptors TNF α receptor (TNFR) I and II. TNF α /TNFR interaction results in stimulation of the underlying cell signaling pathways that lead to nuclear factor kappa B (NF- κ B), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38MAPK, or caspase activation. Thus TNF α simultaneously activates both apoptotic and anti-apoptotic or cell survival signals depending on the factors present in the receptor complex [28]. TNF α , which was discovered in B cells, is known as the most powerful activator of NF- κ B transcription factor. NF- κ B is known to bind its specific ten base pair consensus-binding site in order to regulate over 200 immune, growth, and inflammation genes.

TNF α , as well as other TNF α superfamily members, plays a role in hematopoiesis, host defense, immune surveillance, and proliferation. In this regard, TNF α deregulation leads to numerous diseases, including cancer [28–30].

4. TNF α and inflammation

A TNF α overproduction is involved in numerous chronic inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis [31] chronic hepatitis C [32], or Crohn's disease [33]. An increase in the TNF α level was described in diabetic patients to cause retinopathies [34], while during pancreatitis, the release of TNF α leads to inflammation and cellular damage [35].

Currently, three marketed TNF α antagonists [etanercept (Enbrel[®]), infliximab (Remicade[®]), and adalimumab (Humira[®])] are indicated in diseases characterized by abnormally elevated TNF α levels. Moreover the effectiveness of the treatments varies with agent and disease [36,37]. TNF α is thus leading to various biological phenomena implying different molecular mechanisms and is involved in different cellular responses. Although TNF α is considered to act as a proinflammatory cytokine, it was described as a positive and negative regulator of myeloid cell proliferation and differentiation [38–40]. Effects of TNF α can be mediated either directly [41] or indirectly by inducing other cells to produce cytokines, including hematopoietic growth factors [42,43].

5. Link between TNF α , inflammation and cancer

Abnormal TNF α levels have been confirmed in tumor micro-environment [6]. Moreover, this cytokine is paradoxically able to induce necrosis and to promote tumor development, depending on the levels of TNF α in distinct settings [44]. When TNF α is secreted by tumors and tumor-associated macrophages, it promotes tumor growth and stimulates angiogenesis, whereas when it is administered therapeutically at high doses, it induces an increased permeability of tumor vasculature. Thus, recombinant TNF α , as a tumor regressing agent, is approved in Europe to be administered locoregionally at supraphysiological levels as a therapy for soft tissue sarcoma [45].

Using murine models, it was shown that inflammation-associated hepatocellular carcinogenesis involved the activation of the tumor promoter NF- κ B via the production of TNF α [5]. Moreover several reports associate detection of abnormally high levels of TNF α protein and/or constitutively active NF- κ B in cancer patients with a wide range of tumor types [46], including kidney [47], breast [48], asbestosis induced lung [49], and prostate cancers [50]. Suppression of constitutively active NF- κ B results in cell proliferation arrest and apoptosis, indicating a crucial role for NF- κ B in proliferation and survival [51]. Furthermore chronic bioavailability of TNF α has been correlated with enhanced invasive activities as well as survival of neoplastic cells [44]. Within groups of patients with the same tumor type, higher levels of TNF α have been correlated with advanced tumor stage, greater complications, and shorter survival time [52]. Moreover various cytokines, including TNF α , are overexpressed in pancreatic cancer cells, leading to an NF- κ B activation and as a consequence, to cell growth by inhibiting apoptosis [53]. TNF α also appears as a growth factor regulated by NF- κ B in Hodgkin's lymphoma, T cell lymphoma and glioma [54].

As Rudolf Virchow already suspected in 1863, inflammation and cancer have to be handled together [1,3]. Cancer-associated inflammation includes the expression of cytokines such as TNF α or IL-1 by tumor-associated macrophages, stimulating tumor growth [55]. As TNF α was categorized as a tumor promoter, it is not astonishing that cytokine antagonists as well as NF- κ B inhibitors are already used in cancer therapy and prevention [7,8,44].

6. Deregulation of erythropoiesis by $\text{TNF}\alpha$ in inflammation and cancer

Besides the proinflammatory, proliferative and apoptotic properties, $\text{TNF}\alpha$ was also described as an inhibitor of the erythroid differentiation *in vitro* and *in vivo* [38,39,41,56] (Fig. 3). Its expression is associated with the hematologic diseases Fanconi anemia (FA) [57], myelodysplastic syndromes [58], aplastic anemia [59] and anemia due to chronic diseases [60]. Indeed, in FA patients, $\text{TNF}\alpha$ is significantly overexpressed in stimulated marrow mononuclear cells, which leads to a suppression of erythropoiesis. In bone marrow cultures, the addition of anti- $\text{TNF}\alpha$ increases the size and the number of CFU-E and BFU-E grown from FA patients but not from healthy controls. This indicates that FA subjects have a marrow $\text{TNF}\alpha$ activity that inhibits erythropoiesis *in vitro*. $\text{TNF}\alpha$ plays a relevant role in the pathogenesis of erythroid failure in FA patients [57]. Several *in vitro* studies revealed the inhibitory effects of this cytokine on hematopoietic progenitor cell growth [38,39,41,56,57,61]. It was shown that the inhibition of human CFU-E by $\text{TNF}\alpha$ requires $\text{IFN-}\beta$, which is produced by macrophages in response to $\text{TNF}\alpha$. $\text{TNF}\alpha$

was also shown to have a direct inhibitory effect on Epo-induced generation of GPA positive cells from CD34+ progenitors, leading to the suppression of erythropoiesis and the reduction of the proliferation capacity of GPA positive cells [61]. Interestingly, $\text{TNF}\alpha$ is also believed to play a critical role in many forms of cancer [9,62] and inflammation related anemia [11]. Indeed anemia is considered as a common symptom induced by inflammation and cancer pathologies. In patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia suffering from anemia, the serum levels of $\text{TNF}\alpha$ were significantly higher than in those without anemia [63]. The incidence of anemia was shown to vary with tumor type, stage and patient age. Up to one-third of patients had anemia at diagnosis [64]. This number increases after chemotherapy [65]. Cancer-associated anemia was shown to reduce survival of patients regardless of tumor type [66]. Moreover, the quality of life is considerably affected and is associated with a range of symptoms including fatigue, depression, and dizziness [67]; thus proinflammatory cytokines were recently suggested as the common denominator for cancer related fatigue [68]. Inflammation associated anemia is considered as a main symptom of patients with inflammatory disorders [69]. Prior to the use of erythroid

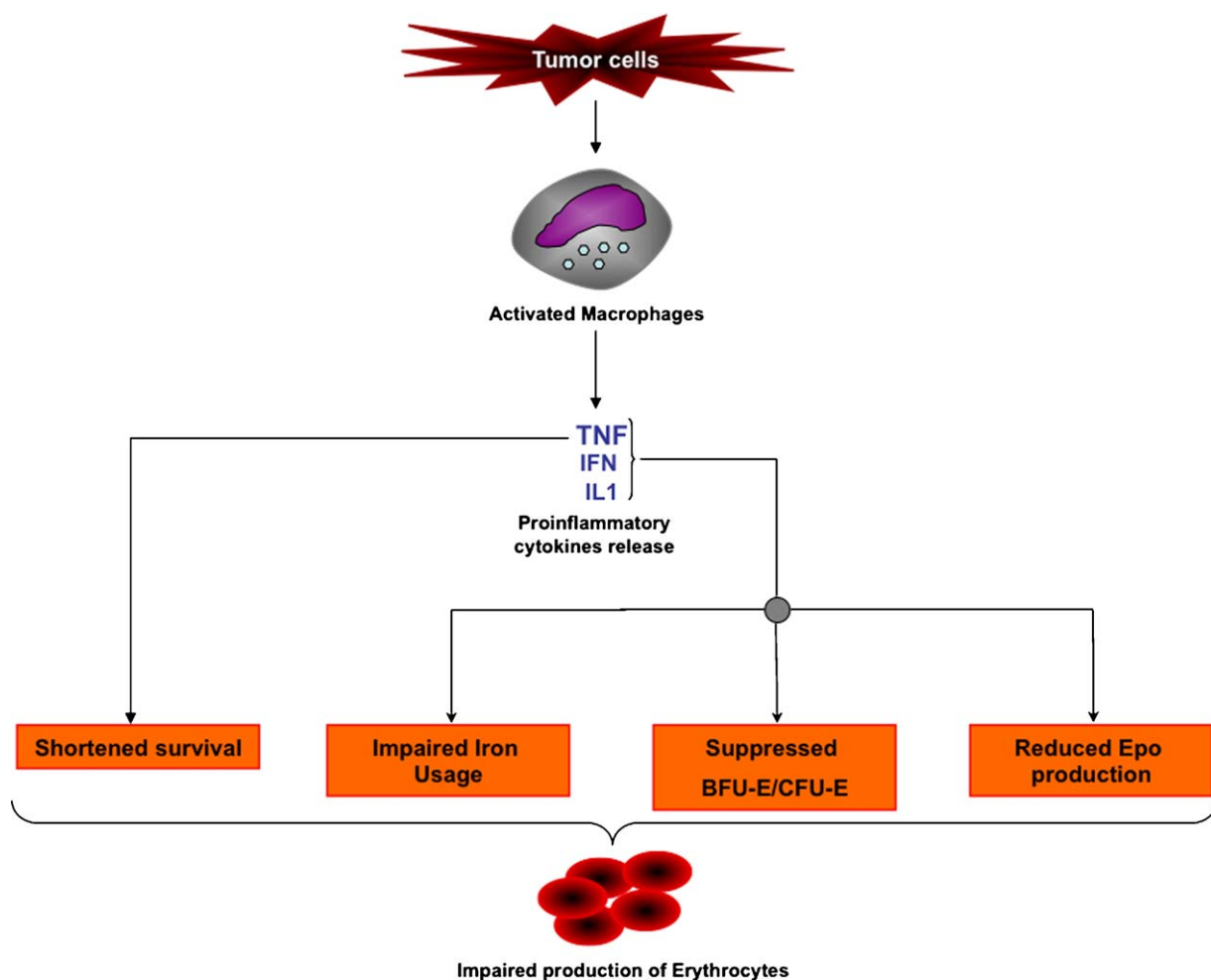


Fig. 3 – Pathophysiology of anemia. Tumor cells act on erythrocytes through macrophages by cytokine release, which leads to impaired erythropoiesis. Released cytokines can affect BFU-E and CFU-E proliferation, iron utilization and Epo production. $\text{TNF}\alpha$ can also affect erythrocyte half-life. $\text{TNF}\alpha$, tumor necrosis factor alpha; IFN, interferon; IL, interleukin; BFU-E, burst-forming units-erythroid; CFU-E, colony-forming units-erythroid; Epo, erythropoietin (adapted from Ref. [68]).

stimulating agents (ESAs), the most frequent treatment of cancer related anemia was blood transfusion. Clinical trials established erythropoietin's ability to increase hemoglobin levels and reduce transfusion requirements [2,3]. However, the conflicting effects of ESAs were recently described in distinct studies [70–72]. Indeed, besides cardiovascular and thromboembolic events in erythropoietin-treated patients, several phase II and III trials showed a significant deterioration of cancer patients survival [73–75]. Unexpectedly, the increased mortality came from accelerated progression of cancer. This reproducible effect was attributed to erythropoietin. Thus, the use of erythropoietin in cancer patients might increase the risk of cancer-associated death. It is suggested that additional phase III trials should be performed to determine whether erythropoietin is safe when used in accordance with FDA-approved indications. One claims that waiting for these further studies to modify or stop Epo treatments could have detrimental impact on many cancer patients [70]. In this context, controversial effects of erythropoietin in cancer-related anemia makes necessary to further investigate the molecular mechanisms involved in anemia and to identify new targets for drug development as well as to detect more significant predictors. In order to improve quality of life, several drugs are under investigation for the treatment of different forms of anemia. Jelkmann reviewed several anti-anemic drugs and techniques based on Epo gene expression [71,76].

Additionally, our group previously reported that TNF α -mediated inhibition of K562 cell differentiation was correlated to GATA-1 downregulation [77], GATA-1/GATA-2 unbalance in favor of GATA-2 as well as a decrease in the acetylation status of GATA-1 [78,79]. Moreover we suggested a role for p38 in the inhibition of erythroid differentiation by TNF α , in correlation with a reversal of important erythroid transcription factors [78]. Miwatashi et al. already used a novel p38 inhibitor, N-[4-[2-ethyl-4-(3-methylphenyl)-1,3-thiazol-5-yl]-2-pyridyl]benzamide (TAK-715), as an anti-TNF α drug for the treatment of rheumatoid arthritis, presenting anemic complications [11,80].

7. Conclusions

Erythropoiesis is a tightly regulated, complex physiological process leading to the formation of erythrocytes from a pluripotent hematopoietic stem cell. Deregulation can lead to various complications, including anemia. Anemia represents a frequent complication in cancer patients, as well as in patients suffering from inflammatory diseases. Proinflammatory cytokines seem to be overexpressed in these diseases. Anemia considerably affects quality of life and is even considered as an independent bad prognostic factor. On the other hand some studies showed that the use of recombinant Epo as a treatment for cancer related anemia could be inappropriate for cancer patients. For these reasons the molecular mechanisms behind the inhibitory effect of TNF α on erythroid differentiation need to be further elucidated in order to find potential new, and more pointed therapeutic targets for inflammation and cancer related anemia. In this respect, investigations using hematopoietic stem cell culture systems should allow to better understand the impact of TNF α

on the control of erythropoiesis by identifying which specific cellular process is affected, including differentiation and/or apoptosis regulation.

Acknowledgements

Research in M.D.'s lab is supported by the 'Recherche Cancer et Sang' foundation, the 'Recherches Scientifiques Luxembourg' association, Télévie and Action Lions Vaincre le Cancer. I.B. is supported by 'Action Lions Vaincre le Cancer' and C.G. by an AFR grant from FNR Luxembourg. The authors thank M. Groos for collaboration and 'Een Häerz fir kriibskrank Kanner' association for continuous support.

REFERENCES

- [1] Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 2005;7:211–7.
- [2] Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357:539–45.
- [3] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860–7.
- [4] Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004;118:285–96.
- [5] Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004;431:461–6.
- [6] Szlosarek PW, Balkwill FR. Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours. *Lancet Oncol* 2003;4:565–73.
- [7] Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR. Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur J Cancer* 2006;42:745–50.
- [8] Yan L, Anderson GM, DeWitte M, Nakada MT. Therapeutic potential of cytokine and chemokine antagonists in cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006;42:793–802.
- [9] Bokemeyer C, Oechsle K, Hartmann JT. Anaemia in cancer patients: pathophysiology, incidence and treatment. *Eur J Clin Invest* 2005;35(Suppl 3):26–31.
- [10] Allen DA, Breen C, Yaqoob MM, Macdougall IC. Inhibition of CFU-E colony formation in uremic patients with inflammatory disease: role of IFN-gamma and TNF-alpha. *J Invest Med* 1999;47:204–11.
- [11] Papadaki HA, Kritikos HD, Valatas V, Boumpas DT, Eliopoulos GD. Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis is associated with increased apoptosis of bone marrow erythroid cells: improvement following anti-tumor necrosis factor-alpha antibody therapy. *Blood* 2002;100:474–82.
- [12] Robb L. Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene* 2007;26:6715–23.
- [13] Wickrema A, Crispino JD. Erythroid and megakaryocytic transformation. *Oncogene* 2007;26:6803–15.
- [14] Hodges VM, Rainey S, Lappin TR, Maxwell AP. Pathophysiology of anemia and erythrocytosis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;64:139–58.
- [15] Zhao W, Kitidis C, Fleming MD, Lodish HF, Ghaffari S. Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood* 2006;107:907–15.

- [16] Wall L, deBoer E, Grosveld F. The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes Dev* 1988;2:1089-100.
- [17] Merika M, Orkin SH. DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol* 1993;13:3999-4010.
- [18] Morceau F, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M. GATA-1: friends, brothers, and coworkers. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1030:537-54.
- [19] Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 2005;25:1215-27.
- [20] Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12355-8.
- [21] Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V, et al. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 1991;349:257-60.
- [22] Rekhman N, Radparvar F, Evans T, Skoultschi AI. Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev* 1999;13:1398-411.
- [23] Grass JA, Boyer ME, Pal S, Wu J, Weiss MJ, Bresnick EH. GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodelling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8811-6.
- [24] Andrews NC, Erdjument-Bromage H, Davidson MB, Tempst P, Orkin SH. Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature* 1993;362:722-8.
- [25] Lu SJ, Rowan S, Bani MR, Ben-David Y. Retroviral integration within the Fli-2 locus results in inactivation of the erythroid transcription factor NF-E2 in Friend erythroleukemias: evidence that NF-E2 is essential for globin expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8398-402.
- [26] Perkins AC, Peterson KR, Stamatoyannopoulos G, Witkowska HE, Orkin SH. Fetal expression of a human Agamma globin transgene rescues globin chain imbalance but not hemolysis in EKLF null mouse embryos. *Blood* 2000;95:1827-33.
- [27] Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:3666-70.
- [28] Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003;3:745-56.
- [29] Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* 2006;72:1605-21.
- [30] Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:185-91.
- [31] Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 1996;14:397-440.
- [32] Knobler H, Schattner A. TNF- α , chronic hepatitis C and diabetes: a novel triad. *QJM* 2005;98:1-6.
- [33] Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. *N Engl J Med* 1997;337:1029-35.
- [34] Limb GA, Chignell AH, Green W, LeRoy F, Dumonde DC. Distribution of TNF alpha and its reactive vascular adhesion molecules in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 1996;80:168-73.
- [35] Friess H, Guo XZ, Nan BC, Kleeff O, Buchler MW. Growth factors and cytokines in pancreatic carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1999;880:110-21.
- [36] Haraoui B. Differentiating the efficacy of tumor necrosis factor inhibitors. *J Rheumatol Suppl* 2005;74:3-7.
- [37] Haraoui B. The anti-tumor necrosis factor agents are a major advance in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl* 2005;72:46-7.
- [38] Broxmeyer HE, Williams DE, Lu L, Cooper S, Anderson SL, Beyer GS, et al. The suppressive influences of human tumor necrosis factors on bone marrow hematopoietic progenitor cells from normal donors and patients with leukemia: synergism of tumor necrosis factor and interferon-gamma. *J Immunol* 1986;136:4487-95.
- [39] Murase T, Hotta T, Saito H, Ohno R. Effect of recombinant human tumor necrosis factor on the colony growth of human leukemia progenitor cells and normal hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1987;69:467-72.
- [40] Rusten LS, Smeland EB, Jacobsen FW, Lien E, Lesslauer W, Loetscher H, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits stem cell factor-induced proliferation of human bone marrow progenitor cells in vitro. Role of p55 and p75 tumor necrosis factor receptors. *J Clin Invest* 1994;94:165-72.
- [41] Rusten LS, Jacobsen SE. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha directly inhibits human erythropoiesis in vitro: role of p55 and p75 TNF receptors. *Blood* 1995;85:989-96.
- [42] Means Jr RT, Dessypris EN, Krantz SB. Inhibition of human colony-forming-unit erythroid by tumor necrosis factor requires accessory cells. *J Clin Invest* 1990;86:538-41.
- [43] Means Jr RT, Krantz SB. Inhibition of human erythroid colony-forming units by tumor necrosis factor requires beta interferon. *J Clin Invest* 1993;91:416-9.
- [44] Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:135-41.
- [45] van Etten B, van Geel AN, de Wilt JH, Eggermont AM. Fifty tumor necrosis factor-based isolated limb perfusions for limb salvage in patients older than 75 years with limb-threatening soft tissue sarcomas and other extremity tumors. *Ann Surg Oncol* 2003;10:32-7.
- [46] Mantovani G, Maccio A, Mura L, Massa E, Mudu MC, Mulas C, et al. Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in patients with advanced-stage cancer at different sites. *J Mol Med* 2000;78:554-61.
- [47] Yoshida N, Ikemoto S, Narita K, Sugimura K, Wada S, Yasumoto R, et al. Interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and interleukin-1beta in patients with renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2002;86:1396-400.
- [48] Leek RD, Landers R, Fox SB, Ng F, Harris AL, Lewis CE. Association of tumour necrosis factor alpha and its receptors with thymidine phosphorylase expression in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer* 1998;77:2246-51.
- [49] Partanen R, Koskinen H, Hemminki K. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in patients who have asbestosis and develop cancer. *Occup Environ Med* 1995;52:316-9.
- [50] Pfitzenmaier J, Vessella R, Higano CS, Noteboom JL, Wallace Jr D, Corey E. Elevation of cytokine levels in cachectic patients with prostate carcinoma. *Cancer* 2003;97:1211-6.
- [51] Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 2004;6:203-8.
- [52] Bossola M, Muscaritoli M, Bellantone R, Pacelli F, Cascino A, Sgadari A, et al. Serum tumour necrosis factor-alpha levels in cancer patients are discontinuous and correlate with weight loss. *Eur J Clin Invest* 2000;30:1107-12.
- [53] Chang I, Kim S, Kim JY, Cho N, Kim YH, Kim HS, et al. Nuclear factor kappaB protects pancreatic beta-cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *Diabetes* 2003;52:1169-75.

- [54] Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6853-66.
- [55] Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66:1-9.
- [56] Roodman GD. Mechanisms of erythroid suppression in the anemia of chronic disease. *Blood Cells* 1987;13:171-84.
- [57] Dufour C, Corcione A, Svahn J, Haupt R, Poggi V, Bekas AN, et al. TNF-alpha and IFN-gamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis in vitro. *Blood* 2003;102:2053-9.
- [58] Gersuk GM, Beckham C, Loken MR, Kiener P, Anderson JE, Farrand A, et al. A role for tumour necrosis factor-alpha, Fas and Fas-Ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 1998;103:176-88.
- [59] Dufour C, Corcione A, Svahn J, Haupt R, Battilana N, Pistoia V. Interferon gamma and tumour necrosis factor alpha are overexpressed in bone marrow T lymphocytes from paediatric patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2001;115:1023-31.
- [60] Imagawa S, Nakano Y, Obara N, Suzuki N, Doi T, Kodama T, et al. A GATA-specific inhibitor (K-7174) rescues anemia induced by IL-1beta, TNF-alpha, or L-NMMA. *FASEB J* 2003;17:1742-4.
- [61] Xiao W, Koizumi K, Nishio M, Endo T, Osawa M, Fujimoto K, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits generation of glycophorin A+ cells by CD34+ cells. *Exp Hematol* 2002;30:1238-47.
- [62] Kurzrock R. The role of cytokines in cancer-related fatigue. *Cancer* 2001;92:1684-8.
- [63] Capalbo S, Battista C, Delia M, Ciancio A, De Santis G, Dargenio M, et al. Evaluation of tumor necrosis factor-alpha and erythropoietin serum levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with anemia. *Acta Haematol* 2002;108:84-9.
- [64] Knight K, Wade S, Balducci L. Prevalence and outcomes of anemia in cancer: a systematic review of the literature. *Am J Med* 2004;116(Suppl 7A):11S-26S.
- [65] Tas F, Eralp Y, Basaran M, Sakar B, Alici S, Argon A, et al. Anemia in oncology practice: relation to diseases and their therapies. *Am J Clin Oncol* 2002;25:371-9.
- [66] Caro JJ, Salas M, Ward A, Goss G. Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: a systemic, quantitative review. *Cancer* 2001;91:2214-21.
- [67] Pronzato P. Cancer-related anaemia management in the 21st century. *Cancer Treat Rev* 2006;32(Suppl 2):S1-3.
- [68] Engert A. Recombinant human erythropoietin in oncology: current status and further developments. *Ann Oncol* 2005;16:1584-95.
- [69] Andrews NC. Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link. *J Clin Invest* 2004;113:1251-3.
- [70] Blau CA. Erythropoietin in cancer: presumption of innocence? *Stem Cells* 2007;25:2094-7.
- [71] Jelkmann W. Developments in the therapeutic use of erythropoiesis stimulating agents. *Br J Haematol* 2008;141:287-97.
- [72] Rizzo JD, Somerfield MR, Hagerty KL, Seidenfeld J, Bohlius J, Bennett CL, et al. Use of epoetin and darbepoetin in patients with cancer: 2007 American Society of Hematology/American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *Blood* 2008;111:25-41.
- [73] Henke M, Laszig R, Rube C, Schafer U, Haase KD, Schilcher B, et al. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2003;362:1255-60.
- [74] Leyland-Jones B, Semiglazov V, Pawlicki M, Pienkowski T, Tjulandin S, Manikhas G, et al. Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study. *J Clin Oncol* 2005;23:5960-72.
- [75] Wright JR, Ung YC, Julian JA, Pritchard KI, Whelan TJ, Smith C, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of erythropoietin in non-small-cell lung cancer with disease-related anemia. *J Clin Oncol* 2007;25:1027-32.
- [76] Jelkmann W. Control of erythropoietin gene expression and its use in medicine. *Methods Enzymol* 2007;435:179-97.
- [77] Morceau F, Schnekenburger M, Blasius R, Buck I, Dicato M, Diederich M. Tumor necrosis factor alpha inhibits aclacinomycin A-induced erythroid differentiation of K562 cells via GATA-1. *Cancer Lett* 2006;240:203-12.
- [78] Buck I, Morceau F, Cristofanon S, Heintz C, Chateauvieux S, Reuter S, et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits erythroid differentiation in human erythropoietin-dependent cells involving p38 MAPK pathway, GATA-1 and FOG-1 downregulation and GATA-2 upregulation. *Biochem Pharmacol* 2008;76:1229-39.
- [79] Buck I, Morceau F, Cristofanon S, Reuter S, Dicato M, Diederich M. The inhibitory effect of the proinflammatory cytokine TNFalpha on erythroid differentiation involves erythroid transcription factor modulation. *Int J Oncol* 2009;34:853-60.
- [80] Miwatashi S, Arikawa Y, Kotani E, Miyamoto M, Naruo K, Kimura H, et al. Novel inhibitor of p38 MAP kinase as an anti-TNF-alpha drug: discovery of N-[4-[2-ethyl-4-(3-methylphenyl)-1,3-thiazol-5-yl]-2-pyridyl]benzamide (TAK-715) as a potent and orally active anti-rheumatoid arthritis agent. *J Med Chem* 2005;48:5966-79.
- [81] Koury MJ, Sawyer ST, Brandt SJ. New insights into erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 2002;9:93-100.
- [82] Tsai FY, Orkin SH. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* 1997;89:3636-43.
- [83] Shivdasani RA, Orkin SH. Erythropoiesis and globin gene expression in mice lacking the transcription factor NF-E2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8690-4.
- [84] Tsang AP, Visvader JE, Turner CA, Fujiwara Y, Yu C, Weiss MJ, et al. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* 1997;90:109-19.
- [85] Wadman IA, Osada H, Grutz GG, Agulnick AD, Westphal H, Forster A, et al. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J* 1997;16:3145-57.
- [86] Blobel GA, Nakajima T, Eckner R, Montminy M, Orkin SH. CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2061-6.
- [87] Gregory RC, Taxman DJ, Seshasayee D, Kensinger MH, Bieker JJ, Wojchowski DM. Functional interaction of GATA1 with erythroid Kruppel-like factor and Sp1 at defined erythroid promoters. *Blood* 1996;87:1793-801.
- [88] Matsumura I, Kawasaki A, Tanaka H, Sonoyama J, Ezoe S, Minegishi N, et al. Biologic significance of GATA-1 activities in Ras-mediated megakaryocytic differentiation of hematopoietic cell lines. *Blood* 2000;96:2440-50.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm



Review

Erythropoietin, erythropoiesis and beyond

S. Chateauvieux^{a,1}, C. Grigorakaki^{a,1}, F. Morceau^{a,1}, M. Dicato^b, M. Diederich^{a,*}

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

^bCentre Hospitalier de Luxembourg, L-1210 Luxembourg, Luxembourg

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 May 2011
Accepted 29 June 2011
Available online xxx

Keywords:

EPO
EPOR
EPO derivative
Erythropoiesis
Cardioprotection
Neuroprotection

ABSTRACT

Erythropoietin (EPO) is a glycoprotein that is mainly produced in the adult kidney, and it was initially highlighted for its action on the hematopoietic system. Moreover, EPO is also expressed in several non-hematopoietic tissues, where it plays a role in the protection from apoptosis and inflammation due to hypoxia, toxicity or injury. These protective effects are mainly known and studied in cardioprotection and neuroprotection but are also reported in retina degeneration, auditory injury and pancreatic-related diseases. The tissue protective effect of EPO is mainly mediated through the interaction with the heterodimeric receptor EPOR/ β cR. Human recombinant EPO (HuREPO), which has been developed to treat anemia, is not adequate for tissue protection. The low affinity of the alternative receptor for EPO involves the injection of excessive concentration of erythropoiesis-stimulating agents (ESAs), implicating side effects due to the cross-talk with hematopoietic activity. For these reasons, EPO derivatives with less affinity for the EPO homodimeric receptor are under development. In this review, we provide an overview of the erythroid and non-erythroid functions of EPO by detailing the molecular mechanisms activated by the binding of EPO to its receptors in different tissues.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. From EPO production to EPO target genes	000
2. Erythropoietic and non-erythropoietic erythropoietin	000
3. EPO-related protection	000
3.1. Cardioprotection	000
3.1.1. Inflammation	000
3.1.2. Apoptosis	000
3.1.3. Angiogenesis	000
3.2. Neuroprotection	000
3.2.1. EPO in brain development	000
3.2.2. EPO in neuroprotection	000
3.3. Other protections	000
3.3.1. Pancreatic disorder	000
3.3.2. Retinal protection	000
3.3.3. Auditory protection	000
3.3.4. Others	000
4. Conclusion	000
Acknowledgements	000
References	000

1. From EPO production to EPO target genes

More than a century ago, a plasmatic humoral factor was assumed to be essential for red blood cell production. It was called hemopoietin. Hemopoietin was the initial name for erythropoietin (EPO), which was later identified and described as a 34 kDa

* Corresponding author. Tel.: +352 2468 4040; fax: +352 2468 4060.

E-mail addresses: marc.diederich@lbmcc.lu, sebastien.chateauvieux@lbmcc.lu (M. Diederich).

¹ These authors contributed equally.

glycoprotein of 165 amino acids that plays the role of a hormone, cytokine and growth factor. The peritubular interstitial cells of the kidney are believed to be the main producers of EPO [1,2]. Until recently, EPO-producing kidney cells were not clearly identified as reported in various publications [3]. Indeed, the latest study from Frede et al., suggested a potential fibroblast-like/neuronal origin for the EPO-producing cells in the kidney. This work was performed by using Renal Epo Producing Cells (REPC) isolated from a tumor-free tissue. REPC that produce EPO with the typical pattern after 36 h of continuous hypoxia, present neuronal markers and respond to neural growth factors [4]. The incontestable fact is that the EPO gene is mainly expressed in the fetal liver, whereas it is expressed in the kidney after birth, and the kidney then becomes the predominant site of EPO production. Therefore, the liver is a secondary site of EPO production in the adult [5–7]. This differential site expression between prenatal and postnatal life is regulated at the gene transcription level. The EPO gene exhibits different specific sequences in its *cis*-regulatory elements, which provide tissue-specific regulation. Indeed, repression of EPO gene expression in the postnatal liver occurs via a specific negative regulatory liver element (NRLE) located at 3' on the EPO gene, while the expression in the postnatal kidney is dependent on the kidney-inducible element (KIE), located at 5' on the gene [8]. A fundamental discovery revealed that EPO gene expression is dependent on hypoxic conditions in two hepatocarcinoma cell lines HepG2 and Hep3B, attesting that individual cells are sensitive to oxygen (O₂) tension variations [9]. The EPO gene is indeed hypoxia inducible through a 50 bp hypoxia-inducible enhancer [10–12]. The hypoxia responsive elements (HRE) are differentially located in the kidney and in the liver. Using a mutant EPO-GFP transgene containing mutations in the hepatic HRE, the authors demonstrated that the 3' enhancer is a liver-specific and hypoxia-inducible enhancer. However, this region remains dispensable for renal EPO expression [13]. In the kidney, the HRE includes the KIE and is located upstream, 5' on the EPO gene.

Tissue-specific transcription factors bind regulatory sequences to control gene transcription. The proximal hepatic hypoxia-inducible enhancer binds hypoxia-inducible factors (HIF). The three members of the HIF transcription factor family are known as HIF-1, -2 and -3. HIF-1 α was first identified as a mediator of EPO induction in response to hypoxia *in vitro*. However, HIF-2 was later identified as the primary transcription factor that induces EPO expression [14,15] (Fig. 1).

All HIF transcription factors interact with HIF-1 β , which is also known as ARNT (arylhydrocarbon-receptor nuclear translocator), to regulate the genes involved in erythropoiesis, including the EPO gene, as well as in iron metabolism, which is essential for tissue oxygen delivery. HIF transcription factors also play a role in neovascularization and hematopoiesis [16]. On the other hand, the distal site binds the hepatocyte nuclear factor HNF-4 α , which cooperates with HIF [17] through interaction with the transcriptional coactivators CBP/p300. The latter factors interact with the 3' basal transcriptional machinery in the promoter.

Beside the HRE, other regulatory elements in the 5' promoter of the EPO gene have been identified, and these elements have a highly conserved GATA sequence as well as NF- κ B binding motifs [18,19]. The GATA site preferentially binds the transcription factor GATA-2, which has been reported to inhibit EPO gene expression [20,21]. One of the NF- κ B binding sites is adjacent to the minimal HRE of the EPO promoter. Through this specific site, NF- κ B becomes an inhibitor of EPO expression [21] (Fig. 1). The activities of GATA-2 and NF- κ B in HepG2 cells decrease in hypoxia vs. normoxia conditions. However, the inhibition of EPO expression in these cells was correlated with an increased activity of both of these transcription factors, which are induced by the proinflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor (TNF) α in hypoxia conditions [21]. These data

clarified the role of proinflammatory cytokines in the failure of EPO production, which occurs in the anemia of chronic inflammatory diseases and cancers. In recent investigations that examined the effect of TNF α on erythropoiesis, we confirmed that TNF α induced GATA-2 expression in hematopoietic cells. In this case, TNF α -mediated overexpression of GATA-2 was correlated with EPO receptor (EPOR) gene downregulation and the inhibition of hemoglobin production in leukemia cell lines as well as a delayed erythroid development of EPO-stimulated CD34⁺ hematopoietic stem progenitor cells [22–24].

The induction of EPO expression is tightly dependent on the physiological conditions that control its production in the kidney. Hypoxia and anemia are the main events that are able to induce EPO gene expression. Once it is produced, erythropoietin is released in the blood flow to meet the cells expressing EPOR. EPO physically interacts with EPOR homodimers that are expressed on the erythroid cell surface [25] to stimulate erythropoiesis by generating a complex network of molecular signals involved in the control of cell proliferation, differentiation and death (Fig. 1). In the erythroid system, EPOR is highly expressed in cells from the colony forming units-erythroid (CFU-E) to the basophilic erythroblast stage [26]. The EPO/EPOR interaction triggers conformational changes in the extracellular domain of the receptor and consequently the activation of the EPOR-associated Janus Kinase (JAK)-2 by autophosphorylation [27]. JAK2 activation results in the phosphorylation of eight tyrosine residues on the cytoplasmic region of EPOR [28]. These phosphotyrosine residues recruit a variety of Src homology-2 (SH2) domain-containing proteins that initiate various signaling pathways (Fig. 1).

One of the main activated signaling pathway is the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB) AKT pathway. This pathway plays a crucial role in the regulation of erythroid cell survival by protecting them from apoptosis, although this pathway is necessary but not sufficient [29]. PI3K has a catalytic subunit p110 and a regulatory subunit p85, which binds directly to the EPOR via its tyrosine Y479. However, PI3K can also be recruited to EPOR indirectly by other proteins [30] (Fig. 1). Using murine models that do not express PI3Kp85 α , Huddleston et al. showed that p85 α was necessary for fetal erythropoiesis development [31]. The binding and activation of PI3K leads to the phosphorylation of AKT, which in turn activates the proteins involved in erythropoiesis regulation. The PI3K/AKT signaling pathway phosphorylates serine S310 of the transcription factor GATA-1 *in vivo* and *in vitro*, and this phosphorylation enhances GATA-1 activity in erythroid cells [32]. GATA-1 is indeed a key transcription factor for the regulation of erythro-specific genes as well as the antiapoptotic Bcl-X_L gene transcription [33–35] (Fig. 1). The forkhead box O3A (Foxo3A) is another AKT-mediated phosphorylation-relevant transcription factor for erythropoiesis [36–38]. In fact, the phosphorylation of Foxo3A results in the inhibition of its transcriptional activity and subsequently the downregulation of Foxo3A target genes such as the cell cycle inhibitor protein p27^{Kip1}/cyclin dependent kinase (CDK) inhibitor [37,39]. Other Foxo3A target genes that have antiproliferative or proapoptotic functions include the B cell translocation gene 1 (BTG1), the Bcl2-family member BIM and the TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) genes [26,36] (Fig. 1). EPO-mediated activation of PI3K/AKT can also occur via adaptor proteins such as Grb2. In fact, Grb2 is recruited by the phosphorylated tyrosine Y464 of EPOR, triggering the activation of the G-protein RAS and subsequently PI3K phosphorylation. In a similar mechanism, the other EPO-mediated signaling pathway the RAS/RAF/mitogen-activated protein kinase (MAPK)/MEK/ERK1/2 pathway is activated via adaptor proteins [40]. RAF1 activation is correlated with cell proliferation, and importantly, RAF1 inhibits caspase-3 (CASP3) activity, which leads to the arrest of cell differentiation [41,42] (Fig. 1). Moreover, EPO mediates the modulation of MAPKs

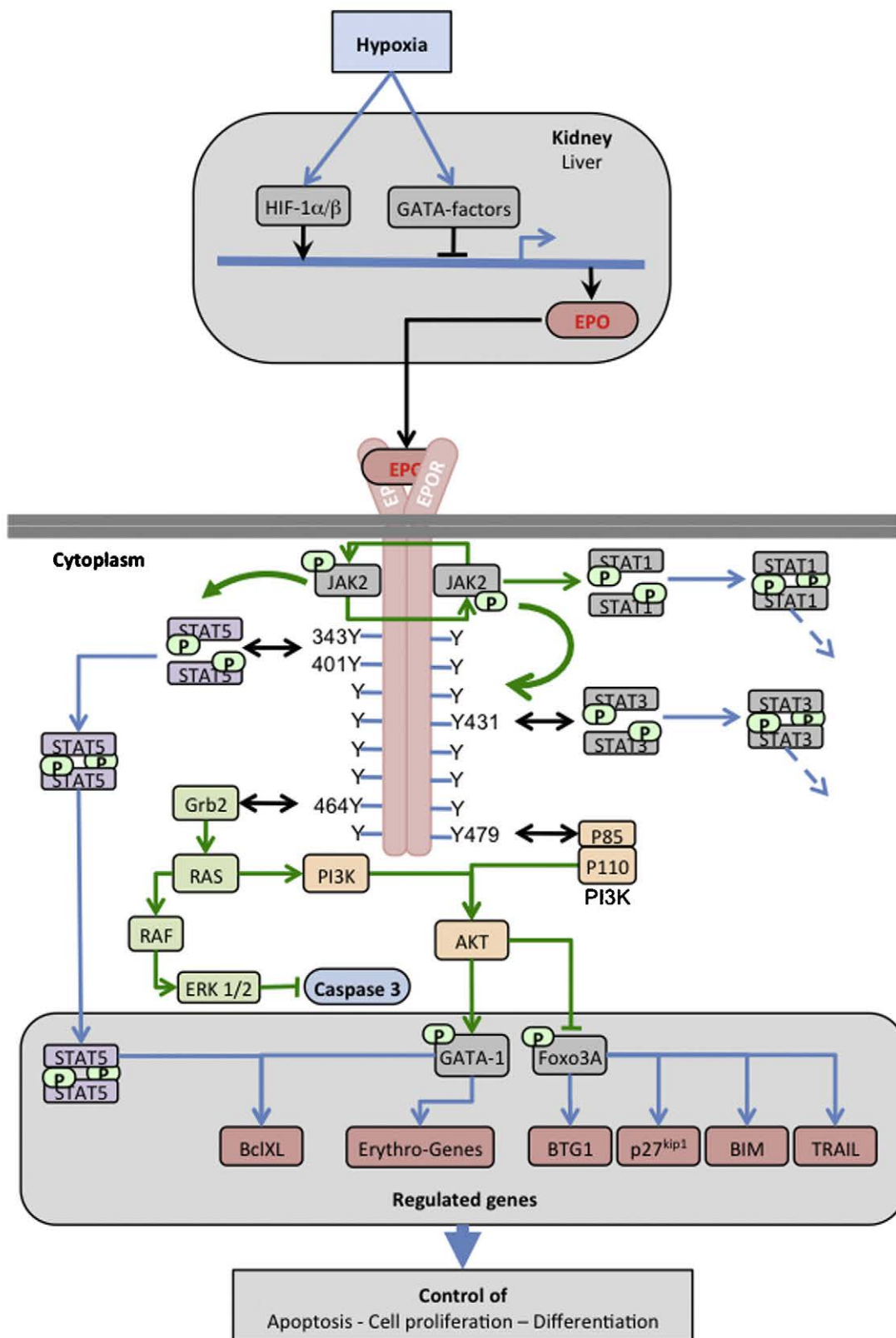


Fig. 1. Under hypoxia conditions, EPO production is induced in adult kidney through the activation of HIF and the down-regulation of GATA transcription factors, acting as inhibitors of EPO gene transcription. Following posttranslational modifications, the glycoprotein EPO is released in blood circulation to reach EPOR expressing hematopoietic cells in bone marrow. Interaction of EPO with EPOR triggers homodimerisation and activation of pre-existing associated JAK2 by trans-phosphorylation. JAK2 activation results in the phosphorylation of eight tyrosine residues (Y) on the cytoplasmic region of EPOR. Phospho-tyrosines are docking sites that recruit a variety of Src homology-2 (SH2) domain-containing proteins. Localisation of the tyrosine residues in the primary structure of EPO protein are indicated only for the described signaling pathways: JAK2/STAT5 (STAT3), PI3K/AKT, Grb2/RAS/RAF/MEK/ERK1/2. Green circles with P represent phosphates and green arrows and bars are phosphorylation activation and inhibition respectively. Double arrows represent protein interaction. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

activation in erythropoiesis, while different studies revealed divergent results concerning EPO-mediated activation of p38 and SAPK/JNK. Indeed, p38 α and p38 γ are expressed during erythroid differentiation [43], and p38 is activated by EPO and is required for EPO-induced erythropoiesis [44,45]. Many cytokines activate SAPK/JNK and p38 in several murine cell lines [30,40,44]. However, proinflammatory cytokines, mainly TNF α , are responsible for the anemia in cancers and chronic inflammatory diseases [46,47]. As for EPO, TNF α is capable of activating p38 by phosphorylation [48,49]. Indeed, in a study examining the TNF α -inhibiting effect on erythropoiesis, we showed that the cytokine induced a rapid phosphorylation of p38 in human leukemia TF-1 cells (10 min), whereas the EPO-mediated activation of p38 occurred later (8 h). The use of p38 α inhibitor SB203580 prevented the inhibitory effect of TNF α on EPO-induced erythroid differentiation, which was shown by hemoglobin production as well as γ -globin and GATA-1 upregulation. In this experimental model, phosphorylated p38 α had an inhibitory effect on the EPO-mediated erythroid differentiation of the TF-1 cell line [22].

The signal transducer and activator of transcription (STAT) factors contain the SH2-domain. Among the seven members of the STAT family known in mammals, EPO activates STAT1, STAT3 and STAT5a/b [22,30,50,51] following their binding to the docking sites of the phosphorylated tyrosines of EPOR. They are then phosphorylated by JAK2, which allows their dimerization and activation as transcription factors. JAK2/STAT5 is the classical pathway activated by EPO in erythroid cells. Notably, EPO-mediated activation of JAK2/STAT5 leads to the upregulation of the antiapoptotic Bcl-X_L gene, therefore protecting proerythroblasts from apoptosis [52] (Fig. 1).

Dysfunctions in EPO/EPOR-mediated signaling pathways lead to serious perturbations of erythropoiesis by affecting cell differentiation, proliferation and apoptosis. Indeed, pathologies such as polycythemia (polycythemia vera (PV) and primary familial and congenital polycythemia (PFCP)) show an absolute increase in the red blood cell mass and the development of erythrocytosis. A constitutive activation of JAK2 caused by a V617F mutation has been incriminated in some patients [53,54]. JAK2V617F activity leads to a permanent activation of STAT5 and therefore of Bcl-X_L in erythroid progenitors, inducing EPO-independent differentiation and colony formation [55]. In PFCP patients, dominant gain-of-function EPOR mutations lead to EPO hypersensitivity of erythroid progenitors and hematopoietic cells, resulting in the prolonged EPO-induced JAK2 and STAT5 activation [56,57]. On the other hand, it was reported that activation of RAS-ERK and PI3K/AKT pathways were abnormally increased in association with EPO hypersensitivity and apoptosis resistance of erythroid precursor cells in PV [58].

As a crucial cytokine for erythroid development, the effects of EPO *via* the EPOR have been studied extensively on the physiological, cellular and molecular levels. However, an increasing number of studies demonstrate that EPOR is expressed in non-hematopoietic tissues and mainly in the brain and heart. Moreover, EPOR is expressed in many cancer cell types. These findings suggest new roles for EPO in non-hematopoietic tissues, while importantly, EPO has been shown to activate tumor cell proliferation. This observation constrains the clinical use of EPO through human recombinant EPO (HuREPO), which requires rigorous care, particularly as anti-anemia treatment for cancer patients. Nonetheless, numerous promising HuREPO molecules have been developed, and have been engineered to be more specifically efficient and have fewer side effects.

2. Erythropoietic and non-erythropoietic erythropoietin

Erythropoietin was initially discovered and purified in small quantities from the urine of patients with aplastic anemia [59]. In

the mid 1980s, the human EPO gene was cloned, and recombinant DNA technology allowed for the large-scale production of erythropoiesis-stimulating agents (ESAs) [60,61]. ESAs mimic the cytokine's physiological function and act on the homodimeric EPOR (Fig. 2).

The first commercialized HuREPO, also known as epoetin, is a full-length unmodified EPO polypeptide that has the identical amino acid sequence to that of endogenous EPO. HuREPO is administered by subcutaneous or intravenous injections two to three times per week, and its half-life is approximately 6 h. HuREPO is the most successful recombinant medicine widely used to correct the low hemoglobin levels in anemia. It is a symptomatic treatment, the action of which triggers the recruitment of erythroid progenitor cells to commit to the erythroid lineage. It is used to treat anemic patients who have low EPO levels, including those patients with chronic diseases (inflammation and cancer) and those with renal failure. HuREPO treatment depends on the type and degree of anemia. The diagnosis of anemia takes into consideration different parameters. Among these are the morphological aspects of the red blood cells (shape, color and size), the amount of red blood cells (production, destruction), the red blood cell indices (mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and mean corpuscular hemoglobin (MCH)) and the circulating levels of EPO. The plasma levels of EPO generally range between 4 and 27 mU/mL. The anemic patients who are treated with HuREPO are those who present low levels of EPO, while in other cases, patients are treated with blood transfusions, nutritional administration steroid therapy and, more drastically, by splenectomy or bone marrow transplants. Of those anemic patients treated, 90% successfully respond to HuREPO, but some patients never achieve satisfactory levels of hemoglobin, or HuREPO may progressively lose its efficacy as a treatment. The hypo-responsiveness of this minority of anemic patients is mostly due to chronic inflammation, infections, iron deficiency, chronic blood loss and EPO antibody-mediated pure red cell aplasia (PRCA) [62–65].

To relieve the patients from the frequent and regular administration of HuREPO and to improve their quality of life (QOL), efforts have been made to produce molecules with longer half-life but with the same efficiency. In this way, different strategies are followed. Darbepoetin α , a novel erythropoiesis stimulating protein (NESP), contains specific modifications such as mutations creating N-linked-glycosylation sites on the glycosylated sites of the native EPO. This product has a 3-fold longer half-life in circulation and permits less frequent administration of the product (intravenous or subcutaneous injections every 2 weeks or monthly) [66,67]. Darbepoetin α is used in patients with chronic kidney disease and in cancer patients under chemotherapy [68–70].

Another strategy to prolong the plasma half-life of the HuREPO molecule is to bond it to different types of polymers. The synthetic erythropoiesis protein (SEP) is a fully synthetic polypeptide with a similar sequence as that of the parent EPO but is linked to negatively charged polymers. This molecule presents higher erythropoietic activity than HuREPO and has a 2.5-fold increased half-life [71]. Moreover, the continuous erythropoietin receptor activator (CERA) is a PEGylated EPO molecule with double mass of the native molecule. The half-life of CERA is remarkably high; it requires 135 h to be eliminated from circulation after intravenous or subcutaneous injection [72]. Furthermore, recombinant dimeric EPO linked *via* a flexible peptide bridge or chemically crosslinked *via* free sulfhydryl groups were also synthesized [73,74]. Finally, a screening peptide strategy allowed the isolation of oligopeptides with low affinity to the EPOR. After further modifications and testing for EPOR specificity, a 20-amino-acid peptide was synthesized (GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG). This oligopeptide,

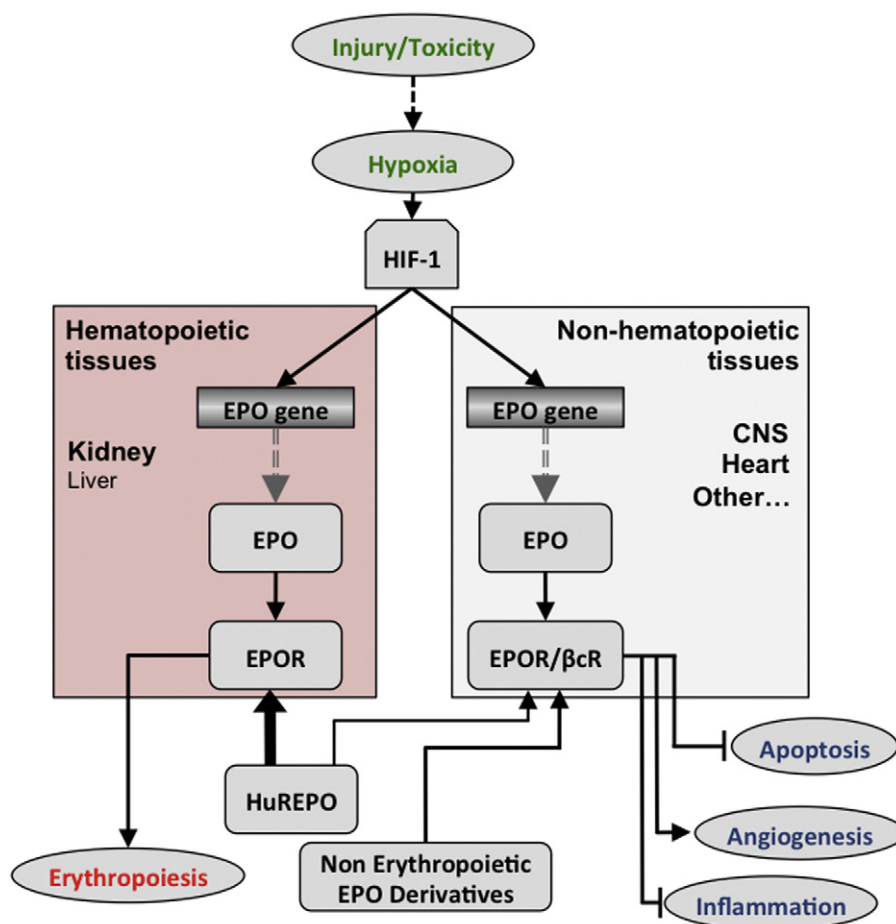


Fig. 2. Hypoxia, injury and toxicity can increase EPO and EPOR expression in hematopoietic and non-hematopoietic tissues. This increase leads to erythropoiesis in hematopoietic tissue or induction of angiogenesis and inhibition of apoptosis and inflammation in non-hematopoietic tissues. Adapted from Xiong et al. [164].

called HematideTM, mimics EPO function and lacks sequence homology with EPO [75]. It is a very promising drug with a variety of advantages. Firstly, the manufacturing process of a synthetic peptide is cheaper compared to the production of recombinant proteins, which requires a cell line. Second, due to its pegylated form, HematideTM is administered less frequently than those needed for the currently marketed ESAs. Third, the fact that it is not a protein makes it more stable at room temperature without the need of cold storage conditions throughout the distribution and the administration to the patients. Moreover, immunologic cross-reactivity of HematideTM does not occur in comparison to those occurring for rhuEPO such as PRCA. In a rat model of EPO antibody-mediated PRCA, HematideTM could stimulate erythroid progenitors and increase hemoglobin levels without activation of an immune response [76]. These encouraging observations led to a phase II clinical trial in order to get the confirmation that HematideTM is not neutralized by antibodies and can rescue patients from developing PRCA. Therefore, using HematideTM could treat active EPO antibody-induced PRCA in patients. Results obtained by *in vivo* and *in vitro* studies about the biologic activity and safety profile of HematideTM have allowed its entry into phase III trials [77–79].

In the case of anemia related pathologies, an alternative therapy could be the stabilization of HIF transcription factors by the use of the prolyl hydroxylase domain-containing protein (PHD) inhibitors. This therapeutic strategy is currently undergoing a phase II clinical trial [80].

Although EPO has beneficial effects on anemia, its administration can trigger an increase in cardiovascular and thromboembolic

events. Moreover, EPO may accelerate tumor growth, but this observation remains debatable [81]. By contrast, Lundby et al., in a recent review, suggested that the administration of HuREPO in healthy humans does not alter their physiological indices and that it is safe to use for experimental purpose [82].

It was established that EPO binds EPOR to induce activation of the erythropoietic pathway, and that the affinity of EPO to its receptor is high. But an initial study with different EPO sensitive cell types and by evaluation of their EPO affinity, showed the existence of at least two types of receptors, one with a high affinity for EPO and the second with an affinity 8–16 times lower (Fig. 2) [83]. Later, a study confirmed the hypothesis that this second receptor may be a heterodimer consisting of EPOR and the β common receptor (β cR, also named CD131). This hypothesis was based on the synergistic action of cytokines IL3, IL5 and GM-CSF with EPO, to promote erythropoiesis [84]. Following that, it was proposed that this alternative receptor could be responsible for the majority of the EPO protective activity that we will mention below [85], and which constitutes a very interesting therapeutic approach. However, recent data questions the exclusivity of this receptor, showing that at least in differentiated neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells, the EPO antiapoptotic activity is due to the homodimeric EPOR [86].

The protective activity of EPO may be due, in some tissues, to the presence of the heterodimeric receptor but the affinity of EPO for the EPOR/ β cR receptor is low, so the tissue-protective properties of EPO are reached with higher dosage than needed for its circulating hormonal effects and concurrently, high doses of

EPO are associated with side effects and abnormally increased erythropoiesis. To circumvent the side effects while preventing the cytoprotective activities of EPO, different non-erythropoietic erythropoietin derivatives have been developed either by chemically modifying or mutating EPO.

The carbamylation of lysines is a characteristic modification that alters protein conformation and function. Leist et al. noted that carbamylated EPO (CEPO) lacks erythropoietic activity but keeps the neuroprotective effect of EPO [87]. CEPO is also known for its capacity to protect the kidneys from ischemic injury [88] as well as for its cardioprotective and neuroprotective properties [89,90]. CEPO has the same half-life as HuREPO and overcomes the platelet reactivity induced by high doses of EPO [91].

The difficulties in the production and storage at cold conditions to preserve stability led to the development of other small alternative molecules. Based on the tertiary structure of EPO, helix B surface peptides have been developed. These peptides are less expensive to produce and more stable. Moreover, they display less immunogenicity and have tissue-protective effects [92,93]. The QEQLERALNSS peptide protects cardiomyocytes from TNF α -induced apoptosis *in vivo* and *in vitro* [94]. These oligopeptides mimic the 3D structure of EPO, and they present a promising alternative to CEPO for therapeutic use and the study of EPO-mediated cytoprotection.

Carbamylated darbepoetin alpha (C-darbe) is synthesized using the same protocol as that for CEPO. Ramirez et al. found that C-darbe protects endothelial progenitor cells from inflammation-induced apoptosis without stimulating erythropoiesis [95].

AsialoEPO is obtained by the enzymatic conversion of HuREPO using a sialidase that removes the sialic acid from HuREPO. The plasma half-life of the obtained product is between 1 and 2 h, and its binding affinity to EPOR is the same as that of HuREPO. The shorter half-life of AsialoEPO in comparison with that of HuREPO did not trigger the commitment of erythroid progenitors to mature erythrocytes in circulation, so the hemoglobin concentration did not increase. Erbayraktar et al. also demonstrated the neuroprotective capacity of AsialoEPO *in vivo* [96].

S100E is an EPO mutant generated by site-directed mutagenesis of the EPO-encoding sequence. It lacks an affinity for EPOR but retains the tissue-protective effect of EPO without any hematopoietic bioactivity [87]. S100E promotes neuroprotective, post-ischemic neurologic function improvement [90] and protects against ocular photoreceptor degeneration [97].

3. EPO-related protection

In addition to the key roles of EPO in differentiation, proliferation and inhibition of cell death, emerging evidence has suggested that EPO exerts cytoprotective effects on non-erythroid cells. Moreover, the data have often shown that EPOR is expressed in non-hematopoietic tissues, including the brain [98,99] and heart [100] as well as the small bowel [101], uterus [102], kidney [103] and pancreatic islets [104]. As described above, the initially developed recombinant EPO mimicked all of the properties of the native EPO. Then, the other derivatives of EPO have targeted some of these properties, such as the capacity for non-hematopoietic tissues protection. Cardioprotection and neuroprotection are the main areas that have been studied for the protective activities of erythropoietin.

3.1. Cardioprotection

Ischemic-reperfusion injury (I/R) refers to tissue damage caused by the return of blood supply to the tissue after a period of ischemia. I/R occurs in cell death, myocardial infarction (MI), myocardial remodeling and the functional decline of the heart.

The use of HuREPO or EPO derivatives, such as CEPO, Darbepoetin, and others, are different methods to avoid ischemia injury. Postconditioning (IPost) consists of a brief intermittent ischemia, applied during the onset of reperfusion after a long period of ischemia [105]. A recent study that compared the efficiency of this method to EPO treatment by evaluating the size of the infarct showed that EPO exerts a better protective effect than IPost against reperfusion injury [106].

The rapid effect of cardiovascular protection induced by pretreatment with EPO, with regard to I/R and MI, involves a mechanism distinct from hematopoiesis. The cardioprotective effects of EPO are achieved primarily through the inhibition of myocardial apoptosis, limiting the infarct expansion, and attenuating the post-infarct deterioration of hemodynamic function, the reduction of inflammation, and the induction of angiogenesis (Figs. 2 and 3). Interestingly, following MI, the heart seems to be able to produce erythropoietin, albeit a negligible amount, which is probably induced by HIF-1 α , the main transcriptional regulator of erythropoietin [107,108] (Fig. 2).

The first mention of EPO cardioprotection was made in 2003 after *in vitro* and *in vivo* experiments in rodents [109–113]. In 2004, Wright et al. confirmed, using a rat model, the action of EPO in cardiovascular protection and the involvement of the preservation of ATP levels in the ischemic myocardium [114]. At the same time, Shi et al. showed in a rabbit model that the rapid activation of potassium channels and protein kinases by EPO represents an important new mechanism for increasing cardioprotection [115]. Primary investigations on the signaling pathways involved in EPO-mediated cardioprotection demonstrated the phosphorylation and activation of JAK1/2, STAT3, STAT5a and PI3K as well as the activation of PKC ϵ , RAF, MEK1/2, p42/44-MAPK and p38-MAPK [116] (Fig. 3).

The cardiac inflammation and apoptosis of myocardial cells are two distinct phenomena in the deterioration of cardiac function, but both are triggered during I/R or MI. The regulation of these phenomena by EPO borrows a common part of the signaling pathway. In recent years, several independent teams working on different models have involved the same signaling pathway, with little variance in the regulation of cardiomyocyte apoptosis and inflammation by EPO. The first key molecule highlighted in this regulation is AKT, already known to be involved in the regulation of apoptosis, including cardiomyocyte apoptosis. AKT normally acts through the inhibition of proteins such as Bcl2-antagonist of cell death (BAD), Caspase 9 (CASP9) or forkhead receptor ligand (FKRL)-1 [117,118]. The implication of AKT in cardioprotection and the inhibition of apoptosis and inflammation triggered by EPO appear to involve other signaling pathways (Fig. 3).

3.1.1. Inflammation

The key molecules of inflammation are TNF α , Cyclooxygenase (COX)-2 and IL-1 β . Several articles have highlighted their involvement in the inflammation of the myocardium and have shown that IL-1 β and TNF α are produced in the myocardium and mainly in the cardiac fibroblast [119,120]. The first studies linking EPO and inflammation showed an inhibition of inflammation by the induction of PI3K, Activator Protein 1 (AP-1) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) *via* AKT activation [121], as well as the inhibition of the myocardial expression of IL-6, TNF α , and IL-1 β *via* STAT3/5 signaling [122] (Fig. 3). However, a study using later time points reported the induction of IL-10 and the inhibition of IL-6, IL-1 β , TNF α , NF κ B and, surprisingly, AP-1 [123]. The kinetics of AP-1 activation should therefore be studied in depth.

Proinflammatory protein COX-2 was also studied in the regulation of inflammation by EPO. On the one hand, the inhibition of COX-2 myocardial expression is coupled with the activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 and is indepen-

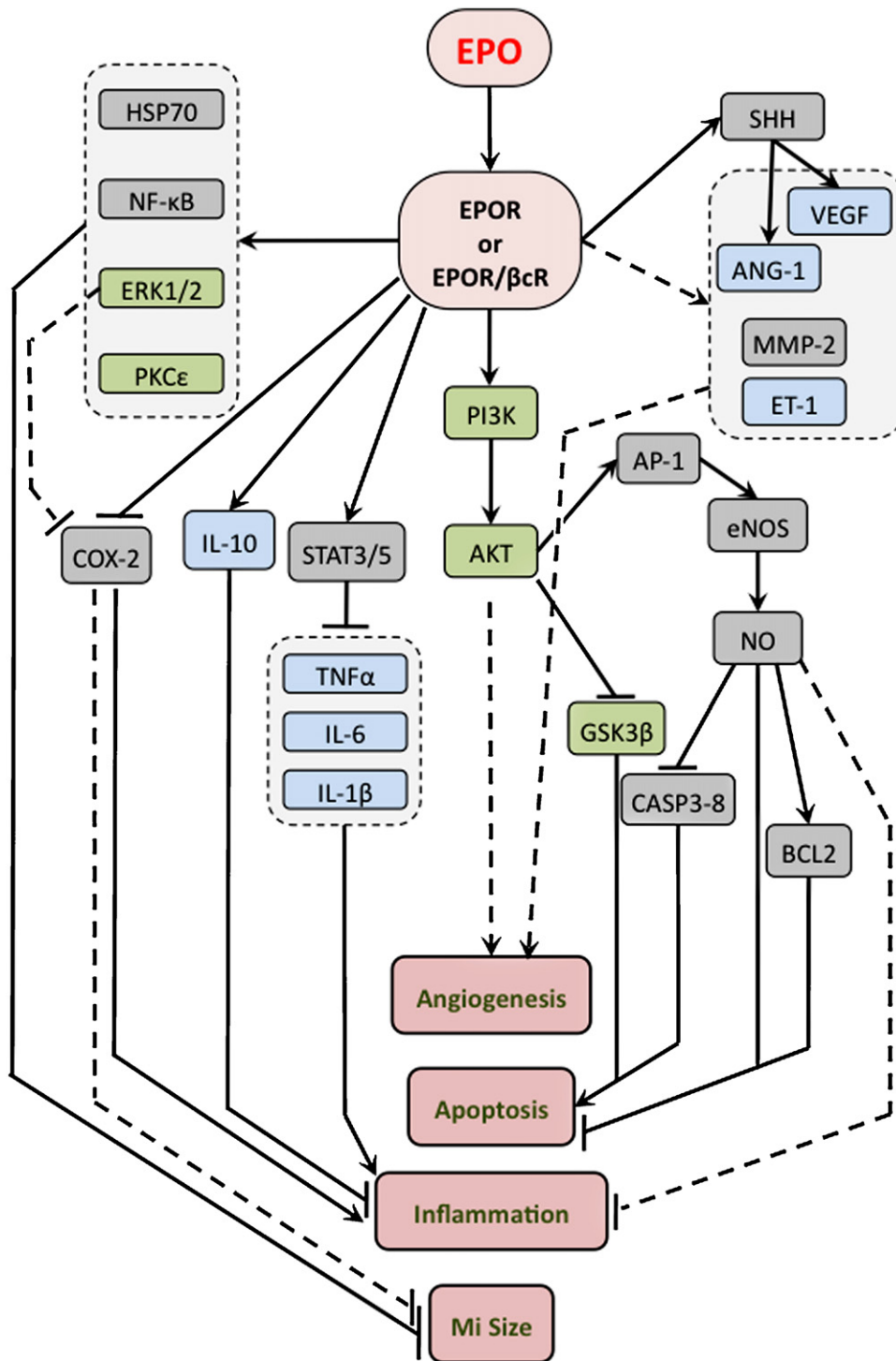


Fig. 3. Overview of molecules and pathways implicated in tissues protection and leading to inhibition of apoptosis, inhibition of inflammation, induction of angiogenesis, and decrease of Myocardial Infarction (MI) size. Solid lines: established relationship; Dashed lines: direct relationships not proved; arrow: positive regulation; Bar: inhibition. Green proteins: reperfusion injury salvage kinases (RISK); blue proteins: cytokines. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

dent of AKT and STAT5 modulation [124]. On the other hand, EPO induces the expression and activity of COX-2 and subsequently the production of its products, such as prostaglandin PGE2 and PGF2 α , leading to a decreased infarct size [125] (Fig. 3).

3.1.2. Apoptosis

The antiapoptotic effect of erythropoietin on cardiomyocytes was discussed for the first time by Calvillo et al. [110] and was validated in several articles. The signaling pathways were defined

gradually from a first observation *in vivo* and *in vitro*, showing that AKT is the central molecule [113,126]. AKT induces eNOS, NO, and Bcl2 [127]; inhibits CASP3 and CASP8 [128]; and is activated by EPOR through PI3K [129] (Fig. 3).

Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) is known to be involved in the apoptosis of myocardial cells by inhibiting Bcl2 and activating the proapoptotic protein BAX. EPO inhibited apoptosis through the activation of AKT and the phosphorylation of GSK-3 β to its inactive form [130]. Kim et al. completed these observations,

showing that the EPO-mediated GSK-3 β inactivation is PI3K-dependent in mice cardiomyocytes [131]. Some of the elements not validated in this study are in favor of the action by GSK-3 β on NO and Bcl2, but this option deserves more targeted studies (Fig. 3).

3.1.3. Angiogenesis

The heart ischemia corresponds to a decrease in blood flow toward the myocardial cells. Angiogenesis is the formation of new capillary vessels from the preexisting vessels, thus optimizing the oxygen delivery to tissues. This mechanism is a solution for improving cardiac function by restoring perfusion. The endothelial cells of the blood vessels express EPOR and are able to proliferate in response to treatment with EPO [132,133]. Many studies examining the effect of EPO on endothelial cell proliferation or blood capillary formation have validated these data. However, few studies have provided a complete mechanism. The regulation of angiogenesis can be achieved through Endothelin-1 (ET-1), as the use of anti-endothelin-1 antibody blocks EPO-induced angiogenesis [134]. However, no further studies have been conducted on this mechanism. Other studies have implicated JAK2 phosphorylation or the production of matrix metalloproteinase-2 (MMP2) without validating the hypothesis by using specific inhibitors. Finally, EPO regulates the expression of VEGF, a cytokine involved in the proliferation of endothelial cells, via EPOR [135,136]. With regard to the regulation of VEGF expression in the mediation of EPO-induced signals, a recent *in vitro* study showed that a deletion of Sonic hedgehog (SHH) abolished the EPO-induced cardioprotection, highlighting the central role of SHH [137]. Furthermore, results also showed the involvement of angiopoietin-1 (ANG-1), and finally, unlike the aforementioned studies, there was a lack of STAT3 effect in this model of cardioprotection (Fig. 3).

In a very interesting study, Teng et al. recently focused on the *in vivo* effect of EPO on endothelial cells. The study examined Δ EPOR-mice, which expressed EPOR only in hematopoietic and endothelial cells. In addition to confirming the involvement of the AKT/NO/eNOS and the MEK/ERK pathways, the study results suggested that the endothelial response is probably sufficient for an acute EPO-mediated cardioprotection effect [138] and that therefore, this cardioprotection does not necessarily require an effect on myocardial cells.

Despite the importance of studies that validate the involvement of EPO in regulating angiogenesis, especially after myocardial ischemia, the exact principle of this regulation has not been completely elucidated; some remaining contradictions must be considered.

The term Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK) pathway is currently used to define the group of protein kinases involved in reperfusion injury cardioprotection, and these include PI3K, AKT, ERK1/2 and MAPK [139]. The cardioprotection mediated by EPO has some limits. Some diseases affect one or more signaling pathways activated by EPO; for example, diabetes mellitus affects the signaling pathway of RISK. In a type 1 diabetes rat model, EPO neither decreased the infarct size nor increased the phosphorylation of AKT, ERK1/2, and GSK-3 β . A direct inhibition of GSK-3 β was proposed to provide an alternative strategy to protect diabetic hearts against I/R injury [140] (Fig. 3).

3.2. Neuroprotection

The EPOR protein is expressed in the brain by different cell types, such as neural progenitor cells (NPC), astrocytes, neurons and oligodendrocytes. Brain cells may also produce EPO under hypoxic conditions to enable NPC proliferation and differentiation. In experimental models of hypoxia-ischemia (HI) or stroke, an injection of EPO can reduce the size of lesions and brain damage [116].

3.2.1. EPO in brain development

EPO and its receptor are expressed in specific regions of the embryonic and adult brain (shown in the rat, monkey and human), and this expression decreases dramatically during development. Liu et al. effectively demonstrated that EPOR mRNA expression decreased by 1 to 3% of the level observed in hematopoietic tissues in mice [141]. EPO appears to be mainly expressed by astrocytes, while EPOR is expressed by neurons [99], which corresponds to the neurotrophic activity of EPO in the cerebral system during development. This hypothesis was supported by mice experiments in which EPO or EPOR was knocked out, leading to embryonic death. The cause of death was due not only to erythropoiesis failure, but also to the failure of brain development, as there was slowed proliferation and increased sensitivity to hypoxia [142]. This study also showed that the conditional knockdown of EPOR leads to a specific deficit in post-stroke neurogenesis by the impaired migration of NPC to the peri-infarct cortex. Several other studies support the mechanisms of EPO in neural development. Indeed, EPO stimulates the differentiation from pluripotent progenitor cells to NPC *in vitro* [143] as well as the neural differentiation of NPC from the subventricular zone [144]. In a model of HI, EPO stimulates neurogenesis in the subventricular zone and promotes the migration of neural progenitors to the injured cortex and striatum [145].

3.2.2. EPO in neuroprotection

EPO has repeatedly been reported to possibly play a role in neuroprotection in adults, but the high molecular weight of its native form, EPO has difficulties in passing through the blood-brain barrier (BBB). For an intravenously injected dose of 5000 U/kg, less than 2% of EPO passes the BBB in the 3 h following injection [146]. Therefore, an inappropriately large injection dose of EPO to achieve effective brain concentrations may be associated with side effects (thrombotic complications, increase in blood pressure, adverse cardiovascular complications in patients with kidney disease, chronic renal failure). However, in some pathologic conditions such as the premature or HI brain, the BBB can be dysfunctional or damaged, resulting in increased permeability.

The non-hereditary injury that affects the central or peripheral nervous system is usually related to trauma, HI, or toxicity. Global or focal cerebral ischemia is followed by damage that is characterized by oxidative stress, excitotoxicity, inflammation and apoptosis.

When neural and astrocyte cells are treated under hypoxic conditions or treated with desferrioxamine (DFX) and cobalt chloride (CoCl₂) and/or inhibited by H₂O₂, the hypoxic stress increases the *in vitro* expression of EPO [147]. HI accelerates neuronal cell death not only by necrosis, but mainly by apoptosis [148]. Moreover, EPO protects against neuronal apoptosis through JAK2/STAT5 activation and regulates the balance between proapoptotic and antiapoptotic pathways, with the induction of Bcl-X_L and Bcl-2 expression [149]. EPO also inhibits CASP3 and CASP9 [150] and regulates BAX through the JAK2 signaling pathway [151] (Fig. 3).

EPO protects against HI injury through angiogenesis via NF- κ B phosphorylation and activation of AKT and PI3K [152]. This mechanism affects neurovascularization through the revascularization of the ischemic zone [153] to improve oxygen delivery in the brain. Moreover, this neurovascularization can promote the production of neuronal stem cells and neuronal and neural progenitors [143] to increase neurogenesis in the ischemic zone [145]. Finally, EPO promotes the differentiation of neural stem cells into astrocytes [154] or oligodendrocytes [155]; such differentiation is correlated with ERK and NF- κ B activation. The EPO capacity to improve the elongation of neurites in spinal ganglion cells has also been reported [156] (Fig. 3).

A recent study improved our knowledge regarding neural angiogenesis and the TNF α /EPO/VEGF relationship [157] by showing that TNF α interacts with its receptor TNF-receptor 1 (TNFR1) and sensitizes neural endothelial cells by inducing the expression of EPOR, thereby increasing EPO-induced angiogenesis by amplifying the activation of the VEGF/VEGFR2 and ANG-1/TIE2 pathways [158] (Fig. 3).

In neural inflammation, IL-1 β corresponds to the early response and induces the synthesis of other cytokines and of the infiltration of leukocytes. An injection of EPO delays the increase in IL-1 β expression and decreases leukocyte infiltration [159]. Moreover, EPO inhibits the production of proinflammatory cytokines that is induced by toxicity or infection [160,161].

The excitotoxicity/neurotoxicity of glutamate is mediated by the N-methyl-D-aspartate receptor and can be improved by treatment with EPO, which involves the cross-talk between the JAK2/STAT and PI3K/AKT signaling pathways [162] and may be through the PI3K-dependent activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels [68]. In a similar manner, EPO reverses the increase of lipid peroxidation and the decrease of antioxidant levels induced by alcohol intake [163].

A recent study provided another insight of the neuroprotection induced by EPO. In this *in vivo* study, which uses EPOR-null mice, EPO protection occurs through the upregulation of antiapoptotic proteins p-AKT and Bcl-X_L in the ipsilateral hippocampus and cortex [164], suggesting that a separate pathway independent of EPOR may be borrowed to mediate this protection.

3.3. Other protections

3.3.1. Pancreatic disorder

In 2003, Fenjves et al. showed that pancreatic islets express the EPOR protein [104]. Subsequently, several studies have examined the effects of EPO on islet cells and especially the effect of this cytokine in the case of types 1 and 2 diabetes or other pancreatic disorders. Types 1 and 2 diabetes mellitus are chronic disorders induced by insulin insufficiency, which results in the deregulation of glucose homeostasis, inducing hyperglycemia and then vascular complications. Diabetic pathologies have distinct mechanisms, but the common element between types 1 and 2 is the insufficiency of the functional pancreatic β -cell mass that is required to maintain euglycemia.

Several papers demonstrated that erythropoietin can provide a beneficial or possibly protective effect in diabetic patients through a direct effect on β cells [165–168]. Data from He et al. suggested that EPO can protect neonatal islet cells (in the porcine model) through the upregulation of Bcl-2 and downregulation of BAX and CASP3 [169] (Fig. 3). Finally, results provided recently by Shuai et al. suggested the requirement of the PI3K/AKT pathway [167], which was already described for cardioprotection. There is also the possibility of an acute necrotizing pancreatitis protection by EPO, but more investigation is needed to clarify that role [170].

Importantly, pancreatic cancer cells also express EPOR, and a study on the effect of EPO in pancreatic cancer showed that EPO enhanced the proliferation of these cells (in a rat model), and this proliferation may correspond to an acute side effect of long-term treatment with EPO [171].

3.3.2. Retinal protection

The retina is the most metabolically active tissue in the human body and is highly sensitive to reductions in oxygen tension or traumatism. EPO is expressed in the adult human retina [172], and EPO has a potent neuroprotective effect in the retina. EPOR expression has been detected in the mouse retina [173] and in the healthy human fetal retina [174]. More recently, EPO expression was highlighted in not only the retina of diabetic retinopathy

patients, but also in non-diabetic donors [175]. Moreover, EPOR and EPOR are present in the vitreous of healthy donors, again with a higher level found in diabetic donors.

Numerous studies show the protective effect of EPO in non-inherited or inherited retinal degenerations [97,176]. This phenomenon is independent of erythropoiesis and is most likely mediated by the EPOR/ β cR receptor [97]. Recently, it was shown that the resistance of retinal progenitor cells (RPC) to hypoxic and superoxide stress is mediated in part by EPO [177]. Nevertheless, the action of this molecule may be partly the basis of the resistance of retinal tissues to moderate and severe stresses due to low oxygen levels. This resistance is mediated by the PI3K/AKT/mTOR pathway [177] and has been validated *in vitro* using specific inhibitors of this signaling pathway and correlated with AKT phosphorylation. In the case of hypoxia and also in the case of white light damage, EPO is induced by HIF-1 α [178] (Fig. 3).

3.3.3. Auditory protection

Hearing loss is one of the most relevant chronic diseases in the elderly, but indeed, 1 in 1000 children is deaf by age 3. In the cochlea, supporting cells and hair cells composes the organ of Corti. The latter cells are responsible for hearing, but they are the most fragile part of the ear. The death of these cells usually occurs as a result of trauma or exposure to toxins and occurs through apoptosis, mediated by the activation of caspases.

EPO expression is exclusively in the supporting cells of the organ of Corti [179]. EPOR is expressed in some cells of the stria vascularis, endothelial cells, auditory hair cells and the supporting cells of the organ of Corti in newborn and adults rats [180]. First, *in vitro* studies showed a protective effect of EPO on hair cells against ischemia-induced and gentamycin-induced damage, albeit with a low efficiency compared with the control [180,181]. Until now, none of the *in vivo* models were conclusive for the effect of EPO in the protection of hair cells, and this field seems poorly represented. However, a study linking HI, hearing and learning modeled the carotid HI in postnatal rats, concluding that EPO affects behavioral and neurological protection, but proposed no explanation for these results [182].

3.3.4. Others

Finally, it is impossible to list the numerous studies showing the beneficial effects of EPO on non-hematopoietic tissues; these studies do not provide a mechanistic explanation of the effects.

EPO can affect bone reconstruction. This effect was shown a few years ago in an experiment involving the injection of EPO between 1 day before and 4 days after a fracture. The results showed a significant increase in the rate of calcification and the expression of EPOR in terminally differentiating chondrocytes within the callus until 2 weeks after the fracture [183].

EPO plays a role in the restoration of dysfunctional microvasculature, which has been demonstrated in murine striated muscle [184]. This angiogenic effect observed seems to depend on eNOS but not inducible NOS (iNOS), when antiapoptotic effect of EPO is maintained is this model independently to both NOS molecules [185].

In rats with unilateral urethral obstruction and treated with a non-erythropoietic EPO derivative (CEPO), CEPO decreases tubular apoptosis and alpha-smooth muscle actin (ASMA) expression in the absence of polycythaemia, and in these same rats, the use of HuREPO induces the same results in addition to a wedge-shaped infarction [186].

4. Conclusion

Since recent years, much evidence through *in vitro* and *in vivo* studies has undoubtedly established that erythropoietin has a

tissue-protective capacity against some trauma, toxins and other damages that are hereditary and non-hereditary. Tissue protection is mainly mediated by the inhibition of apoptosis, inflammation and induction of angiogenesis. This protective ability could be characterized by an increase in native EPO in the injured tissue (such as cardiac and neural tissue); however, the non-hematopoietic tissues produce an amount of EPO unable to induce a protective effect. The protective effect can then be obtained through the injection of recombinant EPO. Nevertheless, such treatment involves high doses of EPO administration, which can lead to serious side effects. Indeed, most EPO-mediated tissue-protection occurs through binding to the heterodimeric receptor EPOR/ β cR, which has a lower affinity for EPO than the homodimeric receptor. Moreover, in the case of neuroprotection, EPO needs to pass through the BBB. In this regard, EPO derivatives are being developed to cross the BBB more easily, decrease administration frequency, increase plasma half-life, decrease side effects and avoid cross-talk with hematopoietic activity.

Acknowledgments

CG is a recipient of a grant from the Aides à la Formation-Recherche (AFR) and SC is a recipient of a grant from the Télévie. Research at the Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer is supported by the “Recherche Cancer et Sang” foundation, by the “Recherches Scientifiques Luxembourg” association, by “Een Haerz fir kriibskrank Kanner” association, by the Action Lions “Vaincre le Cancer” association and by Télévie Luxembourg. Editing costs were covered by the Fonds National de la Recherche (FNR), Luxembourg.

References

- [1] Fisher JW, Koury S, Ducey T, Mendel S. Erythropoietin production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys. *Br J Haematol* 1996;95:27–32.
- [2] Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ. Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood* 1988;71:524–7.
- [3] Suzuki N, Obara N, Yamamoto M. Use of gene-manipulated mice in the study of erythropoietin gene expression. *Methods Enzymol* 2007;435:157–77.
- [4] Frede S, Freitag P, Geuting L, Konietzny R, Fandrey J. Oxygen-regulated expression of the erythropoietin gene in the human renal cell line REPC. *Blood* 2011;117:4905–14.
- [5] Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ, Semenza GL. Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood* 1991;77:2497–503.
- [6] Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, Fournier JG, Wendling F, Casadevall N, et al. Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest* 1988;81:620–3.
- [7] Zanjani ED, Poster J, Burlington H, Mann LI, Wasserman LR. Liver as the primary site of erythropoietin formation in the fetus. *J Lab Clin Med* 1977;89:640–4.
- [8] Semenza GL, Dureza RC, Traystman MD, Gearhart JD, Antonarakis SE. Human erythropoietin gene expression in transgenic mice: multiple transcription initiation sites and cis-acting regulatory elements. *Mol Cell Biol* 1990;10:930–8.
- [9] Goldberg MA, Glass GA, Cunningham JM, Bunn HF. The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:7972–6.
- [10] Beck I, Ramirez S, Weinmann R, Caro J. Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene. *J Biol Chem* 1991;266:15563–6.
- [11] Semenza GL, Wang GL. 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. *Mol Cell Biol* 1992;12:5447–54.
- [12] Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4304–8.
- [13] Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem* 1993;268:21513–8.
- [14] Kapitsinou PP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Davidoff O, Keith B, et al. Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. *Blood* 2010;116:3039–48.
- [15] Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, Wiesener M, et al. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 α target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J* 2004;18:1462–4.
- [16] Ohneda O, Nagano M, Fujii-Kuriyama Y. Role of hypoxia-inducible factor-2 α in endothelial development and hematopoiesis. *Methods Enzymol* 2007;435:199–218.
- [17] Galson DL, Tsuchiya T, Tendler DS, Huang LE, Ren Y, Ogura T, et al. The orphan receptor hepatic nuclear factor 4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin gene expression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1. *Mol Cell Biol* 1995;15:2135–44.
- [18] Blanchard KL, Acquaviva AM, Galson DL, Bunn HF. Hypoxic induction of the human erythropoietin gene: cooperation between the promoter and enhancer, each of which contains steroid receptor response elements. *Mol Cell Biol* 1992;12:5373–85.
- [19] Lee-Huang S, Lin JJ, Kung HF, Huang PL, Lee L. The human erythropoietin-encoding gene contains a CAAT box, TATA boxes and other transcriptional regulatory elements in its 5' flanking region. *Gene* 1993;128:227–36.
- [20] Imagawa S, Yamamoto M, Miura Y. Negative regulation of the erythropoietin gene expression by the GATA transcription factors. *Blood* 1997;89:1430–9.
- [21] La Ferla K, Reimann C, Jelkmann W, Hellwig-Burgel T. Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF- κ B. *FASEB J* 2002;16:1811–3.
- [22] Buck I, Morceau F, Cristofanon S, Heintz C, Chateauvieux S, Reuter S, et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits erythroid differentiation in human erythropoietin-dependent cells involving p38 MAPK pathway GATA-1 and FOG-1 downregulation and GATA-2 upregulation. *Biochem Pharmacol* 2008;76:1229–39.
- [23] Buck I, Morceau F, Cristofanon S, Reuter S, Dicato M, Diederich M. The inhibitory effect of the proinflammatory cytokine TNF α on erythroid differentiation involves erythroid transcription factor modulation. *Int J Oncol* 2009;34:853–60.
- [24] Grigorakaki C, Morceau F, Chateauvieux S, Dicato M, Diederich M. Tumor necrosis factor alpha-mediated inhibition of erythropoiesis involves GATA-1/GATA-2 balance impairment and PU.1 over-expression. *Biochem Pharmacol* 2011;82:156–66.
- [25] Constantinescu SN, Keren T, Socolovsky M, Nam H, Henis YI, Lodish HF. Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4379–84.
- [26] Spivak JL. The anaemia of cancer: death by a thousand cuts. *Nat Rev Cancer* 2005;5:543–55.
- [27] Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1993;74:227–36.
- [28] Frank SJ. Receptor dimerization in GH and erythropoietin action—it takes two to tango, but how? *Endocrinology* 2002;143:2–10.
- [29] Bao H, Jacobs-Helber SM, Lawson AE, Penta K, Wickrema A, Sawyer ST. Protein kinase B (c-Akt), phosphatidylinositol 3-kinase, and STAT5 are activated by erythropoietin (EPO) in HCD57 erythroid cells but are constitutively active in an EPO-independent, apoptosis-resistant subclone (HCD57-SREI cells). *Blood* 1999;93:3757–73.
- [30] Wojchowski DM, Gregory RC, Miller CP, Pandit AK, Pircher TJ. Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Exp Cell Res* 1999;253:143–56.
- [31] Huddleston H, Tan B, Yang FC, White H, Wenning MJ, Orazi A, et al. Functional p85 α gene is required for normal murine fetal erythropoiesis. *Blood* 2003;102:142–5.
- [32] Zhao W, Kitidis C, Fleming MD, Lodish HF, Ghaffari S. Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood* 2006;107:907–15.
- [33] Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood* 1999;94:87–96.
- [34] Nichols KE, Crispino JD, Poncz M, White JG, Orkin SH, Maris JM, et al. Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet* 2000;24:266–70.
- [35] Simon MC, Pevny L, Wiles MV, Keller G, Costantini F, Orkin SH. Rescue of erythroid development in gene targeted GATA-1-mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 1992;1:92–8.
- [36] Bakker WJ, Blazquez-Domingo M, Kolbus A, Besooyen J, Steinlein P, Beug H, et al. FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. *J Cell Biol* 2004;164:175–84.
- [37] Bouscary D, Pene F, Claessens YE, Muller O, Chretien S, Fontenay-Roupie M, et al. Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood* 2003;101:3436–43.
- [38] Kashii Y, Uchida M, Kirito K, Tanaka M, Nishijima K, Toshima M, et al. A member of Forkhead family transcription factor, FKHL1, is one of the downstream molecules of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction. *Blood* 2000;96:941–9.
- [39] Lei H, Quelle FW. FOXO transcription factors enforce cell cycle checkpoints and promote survival of hematopoietic cells after DNA damage. *Mol Cancer Res* 2009;7:1294–303.
- [40] Haq R, Halupa A, Beattie BK, Mason JM, Zanke BW, Barber DL. Regulation of erythropoietin-induced STAT serine phosphorylation by distinct mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 2002;277:17359–66.
- [41] Kolbus A, Pilat S, Husak Z, Deiner EM, Stengl G, Beug H, et al. Raf-1 antagonizes erythroid differentiation by restraining caspase activation. *J Exp Med* 2002;196:1347–53.

- [42] Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, Fishelson S, Bouscary D, Valensi F, et al. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* 2001;193:247–54.
- [43] Uddin S, Ah-Kang J, Ulaszek J, Mahmud D, Wickrema A. Differentiation stage-specific activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:147–52.
- [44] Jacobs-Helber SM, Ryan JJ, Sawyer ST. JNK p38 are activated by erythropoietin (EPO) but are not induced in apoptosis following EPO withdrawal in EPO-dependent HCD57 cells. *Blood* 2000;96:933–40.
- [45] Nagata Y, Takahashi N, Davis RJ, Todokoro K. Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood* 1998;92:1859–69.
- [46] Buck I, Morceau F, Grigorakaki C, Dicato M, Diederich M. Linking anemia to inflammation and cancer: the crucial role of TNF α . *Biochem Pharmacol* 2009;77:1572–9.
- [47] Morceau F, Dicato M, Diederich M. Pro-inflammatory cytokine-mediated anemia: regarding molecular mechanisms of erythropoiesis. *Mediators Inflamm* 2009;2009:405016.
- [48] Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003;3:745–56.
- [49] Yuasa T, Ohno S, Kehrl JH, Kyriakis JM. Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase kinase upstream of MKK6 and p38. *J Biol Chem* 1998;273:22681–92.
- [50] Cheung JY, Miller BA. Molecular mechanisms of erythropoietin signaling. *Nephron* 2001;87:215–22.
- [51] Constantinescu SN, Ghaffari S, Lodish HF. The erythropoietin receptor: structure, activation and intracellular signal transduction. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10:18–23.
- [52] Socolovsky M, Nam H, Fleming MD, Haase VH, Brugnara C, Lodish HF. Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* 2001;98:3261–73.
- [53] James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434:1144–8.
- [54] Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 1995;80:729–38.
- [55] Garcon L, Rivat C, James C, Lacout C, Camara-Clayette V, Ugo V, et al. Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood* 2006;108:1551–4.
- [56] Arcasoy MO, Harris KW, Forget BG. A human erythropoietin receptor gene mutant causing familial erythrocytosis is associated with deregulation of the rates of Jak2 and Stat5 inactivation. *Exp Hematol* 1999;27:63–74.
- [57] Watowich SS, Xie X, Klingmuller U, Kere J, Lindlof M, Berglund S, et al. Erythropoietin receptor mutations associated with familial erythrocytosis cause hypersensitivity to erythropoietin in the heterozygous state. *Blood* 1999;94:2530–2.
- [58] Laubach JP, Fu P, Jiang X, Salter KH, Potti A, Arcasoy MO. Polycythemia vera erythroid precursors exhibit increased proliferation and apoptosis resistance associated with abnormal RAS and PI3K pathway activation. *Exp Hematol* 2009;37:1411–22.
- [59] Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1977;252:5558–64.
- [60] Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985;313:806–10.
- [61] Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:7580–4.
- [62] Druke T. Hyporesponsiveness to recombinant human erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(Suppl 7):25–8 [Official publication of the European Dialysis and Transplant Association – European Renal Association].
- [63] Macdougall IC, Cooper AC. Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17(Suppl 11):39–43 [Official publication of the European Dialysis and Transplant Association – European Renal Association].
- [64] Macdougall IC, Cooper AC. Hyporesponsiveness to erythropoietic therapy due to chronic inflammation. *Eur J Clin Invest* 2005;35(Suppl 3):32–5.
- [65] Casadevall N, Nataf J, Viron B, Kolta A, Kiladjian JJ, Martin-Dupont P, et al. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med* 2002;346:469–75.
- [66] Cervelli MJ, Gray N, McDonald S, Gentgall MG, Disney AP. Randomized cross-over comparison of intravenous and subcutaneous darbepoetin dosing efficiency in haemodialysis patients. *Nephrology* 2005;10:129–35.
- [67] Egrie JC, Browne JK. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(Suppl 3):3–13 [Official publication of the European Dialysis and Transplant Association – European Renal Association].
- [68] Glaspy J, Vadhan-Raj S, Patel R, Bosserman L, Hu E, Lloyd RE, et al. Randomized comparison of every-2-week darbepoetin alfa and weekly epoetin alfa for the treatment of chemotherapy-induced anemia: the 20030125 Study Group Trial. *J Clin Oncol* 2006;24:2290–7 [Official journal of the American Society of Clinical Oncology].
- [69] Ling B, Walczyk M, Agarwal A, Carroll W, Liu W, Brenner R. Darbepoetin alfa administered once monthly maintains hemoglobin concentrations in patients with chronic kidney disease. *Clin Nephrol* 2005;63:327–34.
- [70] Maxwell AP. Novel erythropoiesis-stimulating protein in the management of the anemia of chronic renal failure. *Kidney Int* 2002;62:720–9.
- [71] Kochendoerfer GG, Chen SY, Mao F, Cressman S, Traviglia S, Shao H, et al. Design and chemical synthesis of a homogeneous polymer-modified erythropoiesis protein. *Science* 2003;299:884–7.
- [72] Macdougall IC. CERA (Continuous Erythropoietin Receptor Activator): a new erythropoiesis-stimulating agent for the treatment of anemia. *Curr Hematol Rep* 2005;4:436–40.
- [73] Sytkowski AJ, Lunn ED, Risinger MA, Davis KL. An erythropoietin fusion protein comprised of identical repeating domains exhibits enhanced biological properties. *J Biol Chem* 1999;274:24773–8.
- [74] Sytkowski AJ, Lunn ED, Davis KL, Feldman L, Siekman S. Human erythropoietin dimers with markedly enhanced in vivo activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1184–8.
- [75] Fan Q, Leuther KK, Holmes CP, Fong KL, Zhang J, Velkovska S, et al. Preclinical evaluation of Hematide, a novel erythropoiesis stimulating agent, for the treatment of anemia. *Exp Hematol* 2006;34:1303–11.
- [76] Woodburn KW, Fan Q, Winslow S, Chen MJ, Mortensen RB, Casadevall N, et al. Hematide is immunologically distinct from erythropoietin and corrects anemia induced by antierythropoietin antibodies in a rat pure red cell aplasia model. *Exp Hematol* 2007;35:1201–8.
- [77] Macdougall IC, Rossert J, Casadevall N, Stead RB, Duliege AM, Froissart M, et al. A peptide-based erythropoietin-receptor agonist for pure red-cell aplasia. *N Engl J Med* 2009;361:1848–55.
- [78] Locatelli F, Del Vecchio L. Hematide for the treatment of chronic kidney disease-related anemia. *Expert Rev Hematol* 2009;2:377–83.
- [79] Stead RB, Lambert J, Wessels D, Iwashita JS, Leuther KK, Woodburn KW, et al. Evaluation of the safety and pharmacodynamics of Hematide, a novel erythropoietic agent, in a phase 1, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study in healthy volunteers. *Blood* 2006;108:1830–4.
- [80] Yan L, Colandrea VJ, Hale JJ. Prolyl hydroxylase domain-containing protein inhibitors as stabilizers of hypoxia-inducible factor: small molecule-based therapeutics for anemia. *Expert Opin Ther Pat* 2010;20:1219–45.
- [81] Fandrey J, Dicato M. Examining the involvement of erythropoiesis-stimulating agents in tumor proliferation (erythropoietin receptors, receptor binding, signal transduction), angiogenesis, and venous thromboembolic events. *Oncologist* 2009;14(Suppl 1):34–42.
- [82] Lundby C, Olsen NV. Effects of recombinant human erythropoietin in normal humans. *J Physiol* 2011;589:1265–71.
- [83] Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas Jr F, Tabira T, et al. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem* 1993;268:11208–16.
- [84] Jubinsky PT, Krijanovski OI, Nathan DG, Tavernier J, Sieff CA. The beta chain of the interleukin-3 receptor functionally associates with the erythropoietin receptor. *Blood* 1997;90:1867–73.
- [85] Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:14907–12.
- [86] Um M, Gross AW, Lodish HF. “A classical” homodimeric erythropoietin receptor is essential for the antiapoptotic effects of erythropoietin on differentiated neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells. *Cell Signal* 2007;19:634–45.
- [87] Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, et al. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 2004;305:239–42.
- [88] Imamura R, Okumi M, Isaka Y, Ichimaru N, Moriyama T, Imai E, et al. Carbamylated erythropoietin improves angiogenesis and protects the kidneys from ischemia-reperfusion injury. *Cell Transplant* 2008;17:135–41.
- [89] Sato T, Tanno M, Miki T, Yano T, Shimamoto K, Miura T, et al. Erythropoietin (EPO) affords more potent cardioprotection by activation of distinct signaling to mitochondrial kinases compared with carbamylated EPO. *Cardiovasc Drugs Ther* 2010;24:401–8 [Sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy].
- [90] Villa P, van Beek J, Larsen AK, Gerwien J, Christensen S, Cerami A, et al. Reduced functional deficits, neuroinflammation, and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27:552–63 [Official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism].
- [91] Kirkeby A, Torup L, Bochsén L, Kjalke M, Abel K, Theilgaard-Monch K, et al. High-dose erythropoietin alters platelet reactivity and bleeding time in rodents in contrast to the neuroprotective variant carbamyl-erythropoietin (CEPO). *Thromb Haemost* 2008;99:720–8.
- [92] Brines M, Patel NS, Villa P, Brines C, Mennini T, De Paola M, et al. Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:10925–30.
- [93] Dumont F, Bischoff P. Non-erythropoietic tissue-protective peptides derived from erythropoietin: WO2009094172. *Expert Opin Ther Pat* 2010;20:715–23.

- [94] Ueba H, Brines M, Yamin M, Umemoto T, Ako J, Momomura S, et al. Cardioprotection by a nonerythropoietic, tissue-protective peptide mimicking the 3D structure of erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:14357–62.
- [95] Ramirez R, Carracedo J, Nogueiras S, Buendia P, Merino A, Canadillas S, et al. Carbamylated darbepoetin derivative prevents endothelial progenitor cell damage with no effect on angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 2009;47:781–8.
- [96] Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, et al. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:6741–6.
- [97] Colella P, Iodice C, Di Vicino U, Annunziata I, Surace EM, Auricchio A. Non-erythropoietic erythropoietin derivatives protect from light-induced and genetic photoreceptor degeneration. *Hum Mol Genet* 2011.
- [98] Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, et al. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3717–20.
- [99] Juul SE, Yachnis AT, Rojiani AM, Christensen RD. Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr Dev Pathol* 1999;2:148–58.
- [100] Depping R, Kawakami K, Ocker H, Wagner JM, Heringlake M, Noetzdold A, et al. Expression of the erythropoietin receptor in human heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130:877–8.
- [101] Juul SE, Joyce AE, Zhao Y, Ledbetter DJ. Why is erythropoietin present in human milk? Studies of erythropoietin receptors on enterocytes of human and rat neonates. *Pediatr Res* 1999;46:263–8.
- [102] Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M, Inoue K, Nagao M, Sasaki R. Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem* 1998;273:25381–7.
- [103] Westenfelder C, Biddle DL, Baranowski RL. Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors. *Kidney Int* 1999;55: 808–20.
- [104] Fenjves ES, Ochoa MS, Cabrera O, Mendez AJ, Kenyon NS, Inverardi L, et al. Human, nonhuman primate, and rat pancreatic islets express erythropoietin receptors. *Transplantation* 2003;75:1356–60.
- [105] Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, et al. Post-conditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res* 2004;62:74–85.
- [106] Tamarelle S, Ghaboura N, Treguer F, Khachman D, Croue A, Henrion D, et al. Myocardial reperfusion injury management: erythropoietin compared with postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H2035–43.
- [107] Mengozzi M, Latini R, Salio M, Sfacteria A, Piedimonte G, Gerwien JG, et al. Increased erythropoietin production after myocardial infarction in mice. *Heart* 2006;92:838–9.
- [108] Tekin D, Dursun AD, Xi L. Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and cardioprotection. *Acta Pharmacol Sin* 2010;31:1085–94.
- [109] Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2003;108:79–85.
- [110] Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, et al. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4802–6.
- [111] Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, Lakatta EG, et al. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:11612–7.
- [112] Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, et al. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest* 2003;112:999–1007.
- [113] Tramontano AF, Muniyappa R, Black AD, Blendea MC, Cohen I, Deng L, et al. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:990–4.
- [114] Wright GL, Hanlon P, Amin K, Steenbergen C, Murphy E, Arcasoy MO. Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 2004;18:1031–3.
- [115] Shi Y, Rafiee P, Su J, Pritchard Jr KA, Tweddell JS, Baker JE. Acute cardioprotective effects of erythropoietin in infant rabbits are mediated by activation of protein kinases and potassium channels. *Basic Res Cardiol* 2004;99:173–82.
- [116] Chatagner A, Huppi PS, Ha-Vinh Leuchter R, Sizonenko S. Erythropoietin and neuroprotection. *Arch Pediatr* 2010;17(Suppl 3):S78–84.
- [117] Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke P, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998;282:1318–21.
- [118] Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91:231–41.
- [119] Shivakumar K, Sollott SJ, Sangeetha M, Sapna S, Ziman B, Wang S, et al. Paracrine effects of hypoxic fibroblast-derived factors on the MPT-ROS threshold and viability of adult rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294:H2653–8.
- [120] Burger D, Xenocostas A, Feng QP. Molecular basis of cardioprotection by erythropoietin. *Curr Mol Pharmacol* 2009;2:56–69.
- [121] Rui T, Feng Q, Lei M, Peng T, Zhang J, Xu M, et al. Erythropoietin prevents the acute myocardial inflammatory response induced by ischemia/reperfusion via induction of AP-1. *Cardiovasc Res* 2005;65:719–27.
- [122] Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Maruyama R, Li L, et al. Reduction of inflammatory cytokine expression and oxidative damage by erythropoietin in chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 2006;71:684–94.
- [123] Liu X, Xie W, Liu P, Duan M, Jia Z, Li W, et al. Mechanism of the cardioprotection of rHPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion. *Life Sci* 2006;78:2255–64.
- [124] Li L, Takemura G, Li Y, Miyata S, Esaki M, Okada H, et al. Preventive effect of erythropoietin on cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Circulation* 2006;113:535–43.
- [125] Liu X, Zhou Z, Feng X, Jia Z, Jin Y, Xu J. Cyclooxygenase-2 plays an essential part in cardioprotection of delayed phase of recombinant human erythropoietin preconditioning in rats. *Postgrad Med J* 2006;82:588–93.
- [126] Burger D, Lei M, Geoghegan-Morphet N, Lu X, Xenocostas A, Feng Q. Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res* 2006;72:51–9.
- [127] Dodd F, Limoges M, Boudreau RT, Rowden G, Murphy PR, Too CK. L-arginine inhibits apoptosis via a NO-dependent mechanism in Nb2 lymphoma cells. *J Cell Biochem* 2000;77:624–34.
- [128] Kim YM, Kim TH, Chung HT, Talanian RV, Yin XM, Billiar TR. Nitric oxide prevents tumor necrosis factor alpha-induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase-8. *Hepatology* 2000;32:770–8.
- [129] Beleslin-Cokic BB, Cokic VP, Yu X, Weksler BB, Schechter AN, Noguchi CT. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood* 2004;104:2073–80.
- [130] Fu P, Arcasoy MO. Erythropoietin protects cardiac myocytes against anthracycline-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:372–8.
- [131] Kim KH, Oudit GY, Backx PH. Erythropoietin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;324:160–9.
- [132] Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, Levinson R, Steiner M. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5978–82.
- [133] Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, et al. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3974–8.
- [134] Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, et al. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 1999;93:2627–36.
- [135] Nakano M, Satoh K, Fukumoto Y, Ito Y, Kagaya Y, Ishii N, et al. Important role of erythropoietin receptor to promote VEGF expression and angiogenesis in peripheral ischemia in mice. *Circ Res* 2007;100:662–9.
- [136] Lin JS, Chen YS, Chiang HS, Ma MC. Hypoxic preconditioning protects rat hearts against ischaemia-reperfusion injury: role of erythropoietin on progenitor cell mobilization. *J Physiol* 2008;586:5757–69.
- [137] Ueda K, Takano H, Niitsuma Y, Hasegawa H, Uchiyama R, Oka T, et al. Sonic hedgehog is a critical mediator of erythropoietin-induced cardiac protection in mice. *J Clin Invest* 2010;120:2016–29.
- [138] Teng R, Calvert JW, Sibmooh N, Pikhova B, Suzuki N, Sun J, et al. Acute erythropoietin cardioprotection is mediated by endothelial response. *Basic Res Cardiol* 2011;106:343–54.
- [139] Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 2004;61:448–60.
- [140] Ghaboura N, Tamarelle S, Ducluzeau PH, Grimaud L, Loufrani L, Croue A, et al. Diabetes mellitus abrogates erythropoietin-induced cardioprotection against ischemic-reperfusion injury by alteration of the RISK/GSK-3beta signaling. *Basic Res Cardiol* 2011;106:147–62.
- [141] Liu C, Shen K, Liu Z, Noguchi CT. Regulated human erythropoietin receptor expression in mouse brain. *J Biol Chem* 1997;272:32395–400.
- [142] Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, et al. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci* 2006;26:1269–74.
- [143] Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian fore-brain neural stem cells. *J Neurosci* 2001;21:9733–43.
- [144] Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* 2004;35:1732–7.
- [145] Iwai M, Cao G, Yin W, Stetler RA, Liu J, Chen J. Erythropoietin promotes neuronal replacement through revascularization and neurogenesis after neonatal hypoxia/ischemia in rats. *Stroke* 2007;38:2795–803.
- [146] Juul SE, McPherson RJ, Farrell FX, Jolliffe L, Ness DJ, Gleason CA. Erythropoietin concentrations in cerebrospinal fluid of nonhuman primates and fetal sheep following high-dose recombinant erythropoietin. *Biol Neonate* 2004;85: 138–44.
- [147] Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, Yvon A, Vivien D, Duchatelle I, et al. Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* 2000;30:271–8.
- [148] Ferriero DM. Neonatal brain injury. *N Engl J Med* 2004;351:1985–95.
- [149] Wei L, Han BH, Li Y, Keogh CL, Holtzman DM, Yu SP. Cell death mechanism and protective effect of erythropoietin after focal ischemia in the whisker-barrel cortex of neonatal rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;317:109–16.
- [150] Spandou E, Soubasi V, Papoutsopoulou S, Karkavelas G, Simeonidou C, Kaiki-Astara A, et al. Erythropoietin prevents hypoxia/ischemia-induced DNA

- fragmentation in an experimental model of perinatal asphyxia. *Neurosci Lett* 2004;366:24–8.
- [151] Kumral A, Genc S, Ozer E, Yilmaz O, Gokmen N, Koroglu TF, et al. Erythropoietin downregulates bax and DP5 proapoptotic gene expression in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Biol Neonate* 2006;89:205–10.
- [152] McPherson RJ, Juul SE. Erythropoietin for infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Curr Opin Pediatr* 2010;22:139–45.
- [153] Wang X, Zhu C, Gerwien JG, Schratzenholz A, Sandberg M, Leist M, et al. The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potentially as erythropoietin. *J Neurochem* 2004;91:900–10.
- [154] Lee SM, Nguyen TH, Park MH, Kim KS, Cho KJ, Moon DC, et al. EPO receptor-mediated ERK kinase and NF-kappaB activation in erythropoietin-promoted differentiation of astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:1087–95.
- [155] Iwai M, Stetler RA, Xing J, Hu X, Gao Y, Zhang W, et al. Enhanced oligodendrogenesis and recovery of neurological function by erythropoietin after neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *Stroke* 2010;41:1032–7.
- [156] Berkingali N, Warnecke A, Gomes P, Paasche G, Tack J, Lenarz T, et al. Neurite outgrowth on cultured spiral ganglion neurons induced by erythropoietin. *Hear Res* 2008;243:121–6.
- [157] Taoufik E, Petit E, Divoux D, Tseveleki V, Mengozzi M, Roberts ML, et al. TNF receptor 1 sensitizes neurons to erythropoietin- and VEGF-mediated neuroprotection after ischemic and excitotoxic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:6185–90.
- [158] Wang L, Chopp M, Teng H, Bolz M, Francisco MA, Aluigi DM, et al. Tumor necrosis factor alpha primes cerebral endothelial cells for erythropoietin-induced angiogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011;31:640–7.
- [159] Sun Y, Calvert JW, Zhang JH. Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. *Stroke* 2005;36:1672–8.
- [160] Kumral A, Baskin H, Yesilirmak DC, Ergur BU, Aykan S, Genc S, et al. Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. *Neonatology* 2007;92:269–78.
- [161] Shen Y, Yu HM, Yuan TM, Gu WZ, Wu YD. Erythropoietin attenuates white matter damage, proinflammatory cytokine and chemokine induction in developing rat brain after intra-uterine infection. *Neuropathology* 2009;29:528–35.
- [162] Byts N, Samoylenko A, Fasshauer T, Ivanisevic M, Hennighausen L, Ehrenreich H, et al. Essential role for Stat5 in the neurotrophic but not in the neuroprotective effect of erythropoietin. *Cell Death Differ* 2008;15:783–92.
- [163] Kumral A, Tugyan K, Gonenc S, Genc K, Genc S, Sonmez U, et al. Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res* 2005;160:146–56.
- [164] Xiong Y, Mahmood A, Qu C, Kazmi H, Zhang ZG, Noguchi CT, et al. Erythropoietin improves histological and functional outcomes after traumatic brain injury in mice in the absence of the neural erythropoietin receptor. *J Neurotrauma* 2010;27:205–15.
- [165] Choi D, Schroer SA, Wang L, Wu X, Woo M. Erythropoietin provides diabetes protection through direct effects on pancreatic β cells. In: *ENDO 2010 The Endocrine Society Annual Meeting*; 2010.
- [166] Shuai H, Zhang J, Yu Y, Zhang M. Expression of EPO receptor in pancreatic cells and its effect on cell apoptosis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2008;28:49–51.
- [167] Shuai H, Zhang J, Xie J, Zhang M, Yu Y, Zhang L. Erythropoietin protects pancreatic beta-cell line NIT-1 cells against cytokine-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Endocr Res* 2011;36:25–34.
- [168] Choi D, Schroer SA, Lu SY, Wang L, Wu X, Liu Y, et al. Erythropoietin protects against diabetes through direct effects on pancreatic beta cells. *J Exp Med* 2010;207:2831–42.
- [169] He H, Wu T, Xiong J, Chen K, Mo Z. Effect of erythropoietin on the proliferation and apoptosis of neonatal porcine islet cells. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2010;35:1115–22.
- [170] Ucan BH, Irkorucu O, Cakmak GK, Tascilar O, Tekin IO, Acikgoz S, et al. Erythropoietin: a possible cytoprotective cytokine in acute necrotizing pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009;16:530–7.
- [171] Bose C, Udupa KB. Erythropoietin enhancement of rat pancreatic tumor cell proliferation requires the activation of ERK and JNK signals. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;295:C394–405.
- [172] Hernandez C, Fonollosa A, Garcia-Ramirez M, Higuera M, Catalan R, Miralles A, et al. Erythropoietin is expressed in the human retina and it is highly elevated in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema. *Diabetes Care* 2006;29:2028–33.
- [173] Zhong L, Bradley J, Schubert W, Ahmed E, Adamis AP, Shima DT, et al. Erythropoietin promotes survival of retinal ganglion cells in DBA/2J glaucoma mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:1212–8.
- [174] Juul SE, Yachnis AT, Christensen RD. Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus. *Early Hum Dev* 1998;52:235–49.
- [175] Garcia-Ramirez M, Hernandez C, Simo R. Expression of erythropoietin and its receptor in the human retina: a comparative study of diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 2008;31:1189–94.
- [176] Loeliger MM, Mackintosh A, De Matteo R, Harding R, Rees SM. Erythropoietin protects the developing retina in an ovine model of endotoxin-induced retinal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:2656–61.
- [177] Sanghera KP, Mathalone N, Baigi R, Panov E, Wang D, Zhao X, et al. The PI3K/Akt/mTOR pathway mediates retinal progenitor cell survival under hypoxic and superoxide stress. *Mol Cell Neurosci* 2011;47:145–53.
- [178] Ren H, Liu NY, Song XF, Ma YS, Zhai XY. A novel specific application of pyruvate protects the mouse retina against white light damage: differential stabilization of HIF-1[alpha] and HIF-2[alpha]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:3112–8.
- [179] Caye-Thomasen P, Wagner N, Lidegaard Frederiksen B, Asal K, Thomsen J. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in the guinea pig inner ear. *Hear Res* 2005;203:21–7.
- [180] Monge A, Nagy I, Bonabi S, Schmid S, Gassmann M, Bodmer D. The effect of erythropoietin on gentamicin-induced auditory hair cell loss. *Laryngoscope* 2006;116:312–6.
- [181] Andreeva N, Nyamaa A, Haupt H, Gross J, Mazurek B. Recombinant human erythropoietin prevents ischemia-induced apoptosis and necrosis in explant cultures of the rat organ of Corti. *Neurosci Lett* 2006;396:86–90.
- [182] McClure MM, Threlkeld SW, Fitch RH. Auditory processing and learning/memory following erythropoietin administration in neonatally hypoxic-ischemic injured rats. *Brain Res* 2007;1132:203–9.
- [183] Holstein JH, Menger MD, Scheuer C, Meier C, Culemann U, Wirbel RJ, et al. Erythropoietin (EPO): EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. *Life Sci* 2007;80:893–900.
- [184] Contaldo C, Meier C, Elsherbiny A, Harder Y, Trentz O, Menger MD, et al. Human recombinant erythropoietin protects the striated muscle microcirculation of the dorsal skinfold from posts ischemic injury in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H274–83.
- [185] Contaldo C, Lindenblatt N, Elsherbiny A, Hogger DC, Borozadi MK, Vetter ST, et al. Erythropoietin requires endothelial nitric oxide synthase to counteract TNF-[alpha]-induced microcirculatory dysfunction in murine striated muscle. *Shock* 2011;35:315–21.
- [186] Kitamura H, Isaka Y, Takabatake Y, Imamura R, Suzuki C, Takahara S, et al. Nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects against tubulointerstitial injury in a unilateral ureteral obstruction model. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:1521–8.



Valproic acid perturbs hematopoietic homeostasis by inhibition of erythroid differentiation and activation of the myelo-monocytic pathway

Sébastien Chateauvieux^{a,1}, Serge Eifes^{a,1}, Franck Morceau^a, Christina Grigorakaki^a, Michael Schnekenburger^a, Estelle Henry^a, Mario Dicato^b, Marc Diederich^{a,*}

^a Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, L-2540 Luxembourg, Luxembourg

^b Luxembourg Medical Center, Luxembourg L-1210, Luxembourg

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2010

Accepted 12 November 2010

Available online 23 November 2010

Keywords:

Differentiation
HDAC inhibitor
Hematopoiesis
Inflammation
Stem cell

ABSTRACT

As a histone deacetylase inhibitor, valproic acid (VPA) is a candidate for anticancer therapy. Besides, VPA exhibits various mechanisms of action and its effects on the molecular basis of hematopoiesis remain unclear. To study the effects of VPA on the hematopoietic system, we performed microarray analysis using K562 cells treated with 1 mM VPA over a 72 h time course. The association between gene ontology (GO) terms and the lists of differentially expressed genes was tested using the Bioconductor package GStats. Enrichment analysis for cellular differentiation pathways was performed based on manually curated gene lists. Results from microarray analysis were confirmed by studying cell differentiation features at the molecular and cellular levels using other hematopoietic cell lines as well as hematopoietic stem/progenitor CD34⁺ cells. Microarray analysis revealed 3440 modulated genes in the presence of VPA. Genes involved in the granulo-monocytic differentiation pathway were up-regulated while genes of the erythroid pathway were down-regulated. This was confirmed by analyzing erythrocytic and myeloid membrane markers and lineage-related gene expression in HEL, MEG01, HL60 as well as CD34⁺ cells. Moreover, GATA-1 and its co-factors (FOG1, SP1) were down-regulated, while myelopoiesis activator PU.1 was up-regulated, in agreement with an inhibition of erythropoiesis. Our functional profiling and cell phenotyping approach demonstrates that VPA is able to alter hematopoietic homeostasis by modifying the cell population balance in the myeloid compartment. This may lead to a potential failure of erythropoiesis in patients with cancer or chronic inflammatory diseases having a well-described propensity to anemia.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Valproic acid (2-propylpentanoic acid) (VPA), is a well known histone deacetylase inhibitor (HDACi). Independent of this property, it is being used as an anticonvulsant agent and is clinically effective as a mood stabilizer in the treatment of manic depression (bipolar affective disorder). Due to its HDAC inhibiting activity and its safe use as a drug for several years, VPA is considered to be a good candidate for anticancer therapy. Indeed, VPA inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo* by decreasing the expression of nitric oxide synthase in endothelial cells following HDAC inhibition [1]. In a large series of preclinical studies, VPA induced differentiation and inhibited cell growth in several

neoplastic cell lines [2]. Leukemic blasts isolated from patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia differentiated *in vitro* at therapeutic concentrations of VPA and the cytotoxicity of Cytarabine (Ara-C) in Philadelphia-positive and promyelocytic leukemia cell lines markedly increased under VPA treatment [3]. Nevertheless, VPA exhibits many controversial or non-beneficial effects for patients. Indeed, it is known to induce apoptosis in a limited number of cell types while being nontoxic or even cytoprotective in other cells [4,5]. Moreover, VPA stimulates activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and in particular the survival factors extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1/2 in different cells [6,7]. Interestingly, an induction of erythropoiesis was observed in epileptic patients following VPA treatment [7] while other studies revealed hematological toxicity of anticonvulsive drugs including VPA, resulting in aplastic anemia [8] and pure red cell aplasia [9,10]. More importantly, VPA was shown as triggering prominent adverse effects such as teratogenicity and liver toxicity. The HDAC inhibiting activity of VPA that may have anticancer activity may also be responsible for its teratogenic side effects [11].

* Corresponding author at: Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC), Hôpital Kirchberg, 9, rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg. Tel.: +352 2468 4040; fax: +352 2468 4060.

E-mail address: marc.diederich@lbmcc.lu (M. Diederich).

¹ These authors contributed equally.

Hematopoiesis gives rise to all circulating blood cells with the crucial role of maintaining hematopoietic homeostasis. Hematopoietic cells display lineage-related gene expression regulated by specific transcription factors (TFs). Deregulation of TFs can trigger the defect of hematopoietic homeostasis. The TFs GATA-1, NF-E2, EKLf, TAL-1 and SP1, among others, have been widely described as key regulators of erythroid-specific genes expression. High levels of GATA-1 are required at the onset of erythropoiesis and the inhibition of interaction between GATA-1 and its co-factor Friend of GATA (FOG1) [12] or the TF SP1 prevents erythropoiesis [13]. Low expression level of GATA-1 leads to elevated expression of GATA-2, inhibiting erythroid differentiation in favor of megakaryopoiesis [14]. Similarly, over-expression of PU.1 inhibits erythropoiesis by interacting with GATA-1 and preventing its binding to target genes [15]. In addition, PU.1 has been reported as promoting granulomonocytic differentiation [16]. This pathway specifically involves the CCAAT/enhancer binding protein alpha (CEBPA) TF, which regulates PU.1 gene expression [17]. Thus, xenobiotic-mediated changes in growth factors, cytokines, and cellular receptors may lead to TF deregulation and hematopoietic homeostasis perturbation.

In order to provide new insights into the effects of VPA on the molecular basis of hematopoietic system, we performed microarray experiments using the human chronic myelogenous leukemia K562 cell line. This is a multi-potent cell line with erythro-, megakaryo- and granulomonocytic features because it was established from cells arrested at an early differentiation stage [18]. Microarray outcomes were corroborated by complementary experiments using other hematopoietic cell lines and CD34⁺ cells. This functional profiling and cell phenotyping approach demonstrates that VPA has a negative effect on erythroid differentiation and a positive effect on the myelo-monocytic pathway, therefore affecting the hematopoietic homeostasis.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and antibodies

Details of reagents and antibodies can be found in [supplemental Materials and Methods](#).

2.2. Cell culture

Details of culture for the human chronic myeloid leukemia (CML) cell lines K562 and MEG01, the human acute myeloid leukemia (AML) cell lines HEL, HL60 and TF-1 (Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany), and for CD34⁺ hematopoietic stem progenitor cells (HSPC) purified from cord blood, are described in [supplemental Materials and Methods](#). Erythroid differentiation was scored by benzidine staining as previously described [19].

2.3. Microarray experiments

Treatments with 1 mM VPA were started in the exponential growth phase of 4×10^6 cells for early time points (2, 6 and 10 h) and 1×10^6 cells for late time points (48 and 72 h). A control sample was performed for each time point. Total RNA was extracted from a batch of 5×10^6 to 1×10^7 cells by TRIzol (Invitrogen, Merelbeke, Belgium) and cleanup was performed by the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands). Quantification of RNA was assessed by Nanodrop (Isogen Life science, Sint-Pieters-Leeuw, Belgium). RNA integrity value >9 was verified using an Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies Belgium, Diegem). Microarray experiments using Agilent 4112F Whole Human Genome Oligo microarrays (Agilent Technologies, Belgium, Diegem) were done according to the manufacturer's protocol with

700 ng of total RNA for the preparation of cDNA probes and Cy5- and Cy3-labeled cRNA probes. The hybridized and washed probes on each glass slide were scanned by an Axon 4100A microarray scanner (Sunnyvale, CA, USA). Axon GenePix Pro software version 6.1 was used for feature extraction. Further details on the microarray analysis procedure are described in [supplemental Materials and Methods](#). Microarray data reported here have been submitted to the Gene Expression Omnibus public data repository under accession number GSE19939.

2.4. Gene ontology based over-representation analysis

The Bioconductor package GOstats [20] was used to test for the association between gene ontology (GO) terms [21] and the lists of differentially expressed genes. Conditional over-representation analysis (ORA) for the GO “Biological process” (BP) and “Molecular Function” (MF) terms based on the lists of positively and negatively regulated genes at the different time point was performed.

The set of genes encompassing all probes on the array with a corresponding “Entrez Gene ID” annotation and annotated with at least one GO term in the tested ontology (BP or MF) was taken into consideration for the enrichment analysis-related gene universe. A significance threshold of $p < 0.01$ was applied.

2.5. Enrichment analysis for cellular differentiation pathways

To gain better insights into potentially induced or repressed cell differentiation pathways, ORA was performed using differentiation-related gene sets. Gene lists for erythroid, megakaryocytic, monocytic or granulocytic differentiation pathways were retrieved by manual curation from PubMed abstracts and the corresponding scientific articles. Only genes that are known to be positively regulated in the related differentiation pathway or well described cell differentiation markers were included into the gene sets ([Table S1](#)). Gene lists were curated in an unbiased manner independently of the lists of differentially expressed genes.

After the manual curation step, only genes that are mutually exclusive in the erythrocyte/megakaryocyte or the monocyte/granulocyte groups of gene sets were retained for enrichment analysis ([Table S2](#)). There are many genes commonly implicated in the regulation of the erythrocyte/megakaryocyte and the monocyte/granulocyte differentiation pathways, respectively.

Enrichment analysis was performed in R [22] using the Fisher exact test by comparing the lists of significantly up- and down-regulated genes at different time points to a background set of genes encompassing all probes on the array with an “Entrez Gene ID” annotation. A cut-off ($p < 0.05$) was applied to detect significantly enriched gene sets in the lists of differentially expressed genes.

2.6. Enrichment analysis for *in silico* predicted transcription factor binding site motifs

Promoter analysis for enrichment of *in silico* predicted transcription factor binding sites (TFBS) was performed using the Clover software [23]. A statistical significance threshold of $p < 0.01$ was applied for detecting enriched TFBS. Only TFBS motifs related to mono-, granulo-, erythro-, or megakaryopoiesis [16,24] were used for enrichment analysis. Details for the enrichment analysis of TFBS motifs are described in [Supplemental Materials and Methods](#) and [Table S3](#).

2.7. Reverse transcription and real-time PCR

Reverse transcription (RT) was performed on 5 µg total RNA using random hexamer primers from the SuperScript™ III first

strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen). Real-time PCR analysis were performed using the Mesa Green qPCR MasterMix Plus for SYBR[®] Assay (Eurogentec, Seraing, Belgium) according to the manufacturer's protocol or the custom BD QZym Assays (BD Biosciences) with provided primers. Real-time PCR were performed according to the manufacturer's instructions using a 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystem, Lennik, Belgium). Quantification was performed in triplicate, and expression levels were normalized using internal standards (Actb and Gapdh). Relative gene expression levels correspond to fold induction compared with untreated cells. The statistics used include average, standard error of the mean and Student *t*-test. Primer sequences are shown in Table S4.

2.8. Colony forming unit assay (CFU assay)

CD34⁺ cells were cultured in MethoCult[®] (StemCell Technologies, Grenoble, France) with 1% penicillin-streptomycin, 2% L-glutamine, 50 ng/mL stem cell factor (SCF), 50 ng/mL IL-3, 10 U/mL EPO with or without 1 mM VPA, and were seeded at a concentration of 500 cells/mL in a 6-well plate. Four wells contained 2 mL of semi-solid medium while 2 wells contained water. Culture was supplemented with EPO every 4 days with or without VPA. The colonies consisting of 50 or more cells were counted and identified under an inverted microscope (Leica, Lecuit, Luxembourg).

2.9. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA), acid extraction of histones, transfection and flow cytometry

Protocols are detailed in supplemental materials and methods. Western blot analysis and EMSA were performed as previously described [25].

3. Results

3.1. Gene ontology enrichment analysis reveals biological topics related to cellular differentiation

Microarray analysis was performed using Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays to identify early (2, 6 and 10 h) and late (48 and 72 h) effects of VPA treatment on gene expression in K562 cells. Cells were cultured with or without VPA treatment over a 72 h period. Gene expression data were obtained from three independent competitive hybridizations comparing treated and untreated cells. To validate microarray gene expression data we performed real-time PCR on 20 genes from the same triplicate RNA samples as used for microarray experiments. The good correlation ($R^2 = 0.66$) validates the quality of microarray data (Table S5).

Using a FDR threshold of 0.001 and a fold change cut-off of 1.5, a total of 3440 differentially expressed genes were identified for further analysis (Table S6). A progressive increase from 279 to 2428 in the number of differentially expressed genes was observed between 2 and 48 h while this number decreased to 1916 at 72 h. In a next step, ORA based on the lists of up- and down-regulated genes by VPA treatment revealed a large number of significant gene ontology (GO) biological process (BP) and molecular function (MF) terms (Tables S7 and S8). Interestingly, many biological topics detected by GO enrichment analysis were related to differentiation. As can be seen in Table S9, the gene lists show a significant association of numerous "apoptosis", "cell cycle and proliferation" and "cytoskeleton" related GO terms, including "anti-apoptosis", "caspase activator activity", "negative regulation of cell proliferation", "regulation of actin cytoskeleton organization" and "microtubule-based movement" among others with the lists of up- and down-regulated genes by VPA-treatment

over time. Other more differentiation-specific GO terms were also significantly associated with the lists of induced and repressed genes by VPA treatment. Among these GO terms, the presence of hematopoiesis-related concepts, including "erythrocyte homeostasis" associated to the negative gene lists at 48 and 72 h, "heme biosynthetic process", associated to the negative gene list at 48 h and "myeloid leukocyte differentiation" associated to the positive gene list at 48 h, led us to investigate in depth the modulating effects of VPA on hematopoiesis.

3.2. VPA induces monocytic and represses erythroid differentiation pathways

In order to assess more precisely the effects of VPA on erythroid, megakaryocytic, monocytic and granulocytic differentiation pathways, and due to the limited number of genes annotated in GO to the respective processes, a list of 218 gene/differentiation pathway relationships were curated from the scientific literature. These genes have been described as markers of these four hematopoietic pathways or as being positively implicated in the corresponding cell differentiation pathways (Table S2). Enrichment analysis was performed based on these gene sets to visualize the effects of VPA on differentiation pathways at the transcriptional level. As can be seen in Table 1, over-represented gene sets were detected over the whole time scale. On one side, enrichment for the erythrocyte gene set was detected for the negatively regulated genes for time points 6, 10 and 72 h. On the other side, the monocyte gene set showed enrichment for the up-regulated genes from 2 to 72 h. Enrichment analysis based on the different hematopoiesis pathway gene sets thus suggests an inhibition of the erythroid and an activation of the monocytic differentiation pathways at the transcriptomic level in K562 cells after VPA treatment.

3.3. VPA modulates hematopoiesis-related transcription factor binding site motifs

To gain further insights into the effects of VPA on cellular differentiation at the level of transcriptional regulation, enriched TFBS motifs were determined in the promoter sets of the significantly up- and down-regulated genes for the different time points. Sixty-six position weight matrices (PWMs) from TransFac 2009.2 were used to detect enriched TFBS motifs specific to mono-, granulo-, erythro or megakaryopoiesis as described in Section 2. Motifs related to 28 PWMs were found to be significantly over-represented at one or more time points (Table 2). Among these DNA motifs, members of the AP-1 family of TFs potentially bind 7 of them. These AP-1-related motifs were significantly associated with the lists of up-regulated genes from 6 to 72 h. Furthermore, PWMs related to the TF CEBPA were significantly enriched in the positive gene lists from 2 to 72 h. Interestingly, for the negative

Table 1

Enriched hematopoietic differentiation-related gene sets for the lists of induced and repressed genes in VPA-treated K562 cells.

	2 h	6 h	10 h	48 h	72 h
Negative					
Erythrocyte	0.345	0.0134	0.0134	0.0959	0.0211
Megakaryocyte	1	1	1	1	1
Granulocyte	1	1	1	0.5870	0.7555
Monocyte	1	1	1	1	1
Positive					
Erythrocyte	1	0.9593	0.7994	0.8790	0.3439
Megakaryocyte	1	0.6543	0.5002	0.7962	0.7680
Granulocyte	0.5851	0.7820	0.9266	0.4915	0.9499
Monocyte	0.0127	4.89E-06	0.0042	0.0141	0.0167

p-Values for the significant gene sets ($p < 0.05$) at corresponding time points are shown in boldface.

Table 2

Significantly over-represented transcription factor binding site motifs for the lists of induced and repressed genes in VPA-treated K562 cells.

Identifier	Factor(s)	2 h		6 h		10 h		48 h		72 h	
		Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
V\$AP1_01	AP1	0.608	0.054	0.785	0.054	0.273	0.038	0.591	0.000	0.953	0.002
V\$AP1_C	AP1	0.689	0.239	0.938	0.211	0.518	0.076	0.695	0.008	0.911	0.001
V\$AP1_Q2	AP1	0.982	0.016	0.911	0.001	0.354	0.002	0.197	0.001	0.929	0.001
V\$AP1_Q2_01	AP1	0.480	0.022	0.546	0.011	0.566	0.020	0.696	0.000	0.699	0.000
V\$AP1_Q4_01	AP1	0.631	0.403	0.913	0.149	0.810	0.115	0.852	0.010	0.904	0.002
V\$AP1_Q6	AP1	0.876	0.082	0.899	0.045	0.508	0.012	0.639	0.009	0.872	0.002
V\$AP1F_Q2	AP1	0.973	0.096	0.746	0.004	0.472	0.006	0.350	0.002	0.968	0.011
V\$CDPCR1_01	CDP	0.009	0.032	0.099	0.002	0.301	0.000	0.302	0.000	0.367	0.000
V\$CEBP_01	CEBPA	0.000	0.001	0.324	0.974	0.529	0.853	0.825	1.000	0.966	1.000
V\$CEBP_C	CEBPA	0.271	0.006	0.467	0.087	0.524	0.096	0.224	0.122	0.460	0.124
V\$CEBP_Q2	CEBPA	0.004	0.000	0.036	0.000	0.141	0.000	0.016	0.000	0.069	0.001
V\$CEBPA_01	CEBPA	0.004	0.002	0.040	0.000	0.106	0.000	0.055	0.001	0.057	0.000
V\$CHOP_01	CEBPA	0.392	0.271	0.840	0.270	0.807	0.009	0.467	0.099	0.052	0.178
V\$CEBP_Q2_01	CEBPA, CEBPE	0.171	0.007	0.541	0.000	0.864	0.000	0.794	0.987	0.264	0.022
V\$CEBP_Q3	CEBPA, CEBPE	0.003	0.004	0.630	0.691	0.869	0.390	0.923	1.000	0.587	1.000
V\$EGR1_01	EGR-1	0.852	0.280	0.490	0.465	0.477	0.502	0.278	0.040	0.987	0.009
V\$KROX_Q6	EGR-1, EGR-2	0.208	0.000	0.057	1.000	0.342	1.000	0.019	1.000	0.062	1.000
V\$GATA1_02	GATA-1	0.006	0.013	0.290	0.080	0.154	0.014	0.005	0.003	0.011	0.005
V\$GATA1_04	GATA-1	0.004	0.073	0.307	0.089	0.278	0.111	0.122	0.000	0.125	0.024
V\$GATA1_05	GATA-1	0.000	0.012	0.010	0.001	0.058	0.001	0.283	0.000	0.166	0.002
V\$GATA1_06	GATA-1	0.002	0.202	0.012	0.003	0.267	0.000	0.172	0.000	0.063	0.000
V\$GATA_C	GATA-1, GATA-2	0.000	0.016	0.018	0.000	0.031	0.000	0.021	0.000	0.020	0.000
V\$GATA_Q6	GATA-1, GATA-2	0.018	0.073	0.070	0.000	0.101	0.000	0.180	0.000	0.056	0.000
V\$GATA2_02	GATA-2	0.006	0.135	0.132	0.003	0.451	0.000	0.319	0.000	0.058	0.000
V\$GATA2_03	GATA-2	0.035	0.309	0.598	0.078	0.813	0.017	0.487	0.056	0.144	0.009
V\$GFI1_01	GFI	0.003	0.000	0.122	0.000	0.582	0.000	0.201	0.003	0.191	0.002
V\$GFI1_Q6	GFI, GFI1B	0.073	0.113	0.279	0.001	0.592	0.002	0.297	0.035	0.009	0.072
V\$CREL_01	NFKB	0.005	0.141	0.472	0.129	0.581	0.321	0.621	0.193	0.700	0.311

"Identifier": indicates the identifier for the position weight matrix as found in TransFac 2009.2. "Factor(s)": human TF(s) implicated in mono-, granulo-, erythro- or megakaryopoiesis known to bind to the corresponding DNA motifs. The *p*-values for positive and negative gene lists are shown and the *p*-values for significantly enriched TFBS motifs (*p* < 0.01) are set in boldface type. Only PWMs with a corresponding *p*-value below the significance threshold (*p* < 0.01) at one or more time points are shown in the table.

gene lists, only at time point 2 h a significant association with CEBPA-related matrixes (V\$CEBP_01, V\$CEBPA_01 and CEBP_Q3) was detected. The V\$KROX_Q6 matrix, a PWM related to the early growth response protein (EGR)-1 and -2 binding site motifs, is found to be significantly over-represented in the promoter sets for the list of positively regulated genes at 2 h. Additionally an EGR-1-specific PWM (V\$EGR1_01) is enriched in the positive gene list at 72 h. A total of eight GATA-1- and/or GATA-2-related PWMs were detected as enriched at one or more time points in the positive and negative gene lists. Among them, two GATA-1-specific PWMs (V\$GATA1_05 and V\$GATA1_06) were significantly enriched over the whole time scale. Interestingly, for time point 2 h, the GATA-related PWMs were only associated to the negative gene list. Altogether, these data suggest a modulation of transactivational activity for hematopoiesis-related TFs by VPA.

3.4. VPA induces myelo-monocytic but not erythrocytic features in hematopoietic cell lines

Based on the microarray results, we investigated the effect of VPA on the myeloid branch of differentiation pathways using K562, MEG01, HEL, and HL60 hematopoietic cell lines. The effect of 1 mM VPA on cell cycle and cell death was analyzed by flow cytometry. VPA induced an increase in G0/G1 phase (from 52.4 ± 5.1% to 78.0 ± 2.9%) and a decrease in S and G2/M phases (from 25.2 ± 1.6% and 17.1 ± 5.9% to 12.4 ± 2.8% and 6.9 ± 1.0%, respectively) in K562 cells, which corresponds to a latency state and correlates with a decreased proliferation. No change was observed in K562 cell death. The cell cycles of HL60 and MEG01 cells were not significantly modified, while a strong increase of cell death was observed for HL60 cells (from 3.83 ± 1.5% to 16.9 ± 4.6%) (Figure S1A).

On one hand, we analyzed the effect of VPA on myeloblastic (CD11b), myelomonocytic (CD14), megakaryocytic (CD41a) and

erythrocytic (CD235a) markers by flow cytometry in K562, HL60 and MEG01 cell lines. The phenotypes of the promyeloblastic HL60 and the promegakaryoblastic MEG01 cells were modified by 1 mM VPA, with a significant increase in CD11b and CD235a for HL60 (ratio of MFI: 3.81 ± 0.8 and 2.64 ± 0.56) as well as CD11b, CD41a increase and CD235a decrease for MEG01 cells (1.68 ± 0.08 and 2.78 ± 0.8 and 0.52 ± 0.052, respectively) after 3 days. Conversely, the phenotype of K562 cells was not significantly altered by VPA treatment (Fig. 1A). Moreover, the expression of genes belonging to the monocytic differentiation network, including CD11b (Table S2) was analyzed by Real-time PCR. Results revealed a significant increase ($2^{-\Delta\Delta Ct} > 2.0$; *p* < 0.05) in the expression of these genes (Fig. 1B). On the other hand, the effect of VPA on erythroid differentiation has been studied. Hemoglobin synthesis has been assessed by benzidine staining in K562 and HEL cells following 0.5, 1 and 2 mM VPA treatments. Results showed no modification in the rate of benzidine positive cells during 3 or 6 days of treatment (data not shown). As shown in Fig. 1C, analysis of erythroid features showed that the levels of globin (HBA and HBG) as well as hydroxymethylbilane synthase (HMBS) gene expression were not induced in K562, MEG01 or HL60 cells. In fact, as shown in Fig. 2B, VPA did not induce γ -globin (HBG) mRNA levels at any concentration, while another HDACi, apicidin (AP), induced a 6-fold increase in its expression. Nevertheless, the HDAC inhibiting activity of 1 mM VPA has been confirmed in these cells as assessed by western blot analysis of acetylated histones (H3 and H4, Figure S2). As expected, this effect was correlated to the increased expression of p21 in K562 cells in a time dependent manner (Figure S3).

3.5. VPA prevents induction of erythroid differentiation

To assess whether VPA promotes myeloid differentiation with depend on erythroid differentiation, we analyzed its effect on the

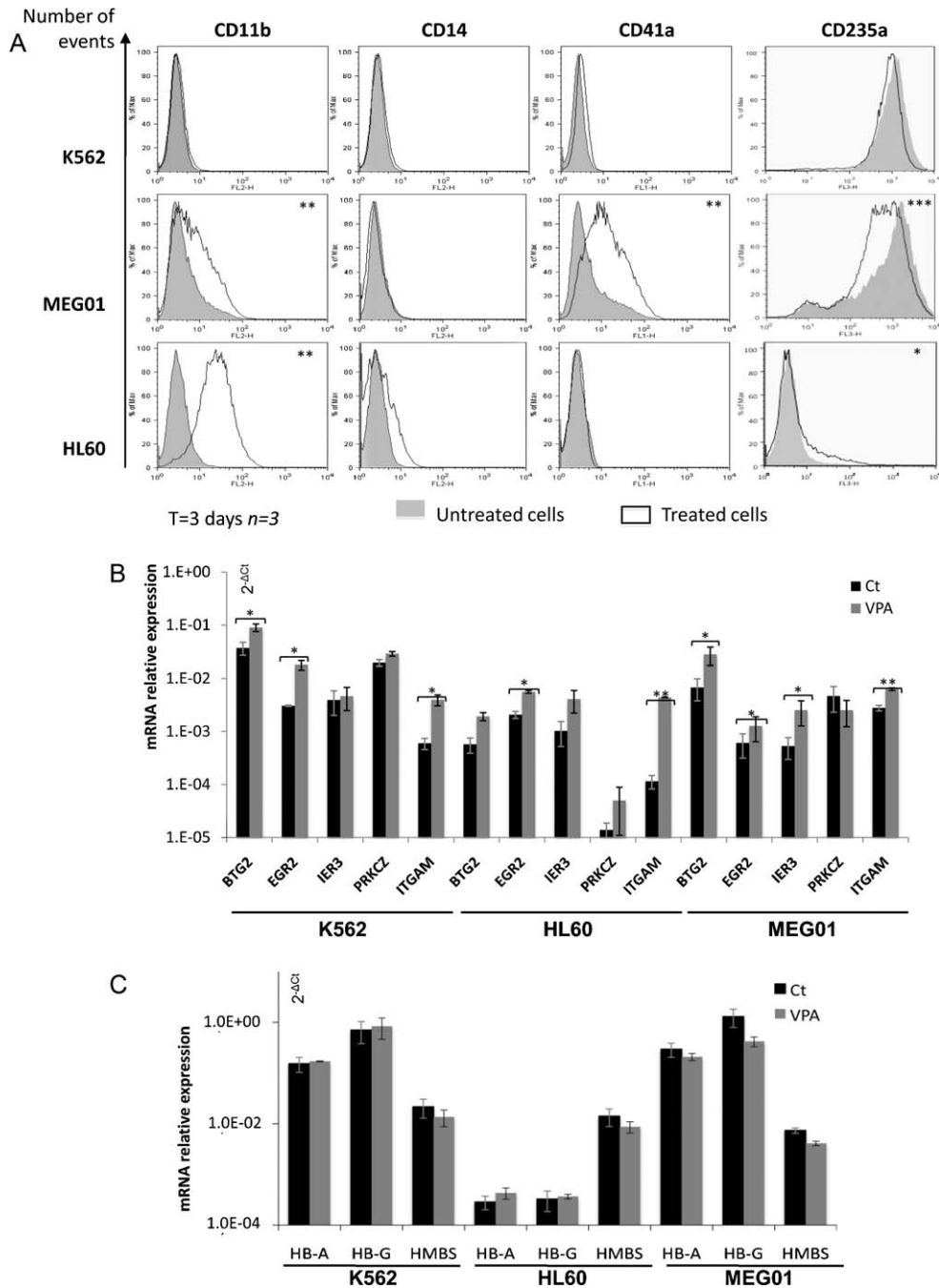


Fig. 1. VPA induces myelocytic but not erythroid markers. (A) Flow cytometry analysis of lineage-related cell surface markers in K562, HL60, and MEG01 cells after 3 days of culture with (black line) or without (gray area) 1 mM VPA. (B) Real-time PCR analysis of monocytic network gene expression in K562, HL60, and MEG01 cells ($n = 3$). (C) Real-time PCR analysis of erythroid genes expression in K562, HL60, and MEG01 cells following 1 mM VPA treatment ($n = 3$). Statistical significance levels * p -values < 0.05; ** p -values < 0.01; *** p -values < 0.001.

induction of hemoglobin production in K562 and HEL cell lines. Hemoglobinization of the cells was induced by using different inducers, aclinomycin A (AC), doxorubicin (DX) [26], radicicol (RD) [25] or hemin (HM). In the presence of 0.5, 1 or 2 mM VPA, AC-induced hemoglobinization of K562 cells was decreased in a concentration dependent manner (data not shown). As shown in Fig. 2A, 1 mM VPA significantly reduced the rate of benzidine positive cells whatever the cell line and the inducer used. Indeed, the proportion of hemoglobin-producing cells decreased by more than 50% as assessed by benzidine staining. The effect was similar with a pre- or a post-treatment by VPA (data not shown). Furthermore, 1 mM VPA significantly abolished RD- and AC-induced over-expression of HBG mRNA in K562 cells as shown by

real-time PCR (Fig. 2B). In the same way, western blot analysis showed that VPA inhibits the HBG protein in both cell lines (Fig. 2C). In agreement with reported cases of aplastic anemia in patients treated with VPA and our microarray data, these results suggest a significant negative effect of VPA on the regulation of erythroid differentiation while myelo-monocytic as well as megakaryocytic features were induced.

3.6. Expression of *GATA-1* and co-factors is affected in VPA-treated cells

Given the effect of VPA on hematopoietic differentiation features, we verified the impact of VPA on specific TFs especially involved in the regulation of erythroid differentiation. Western

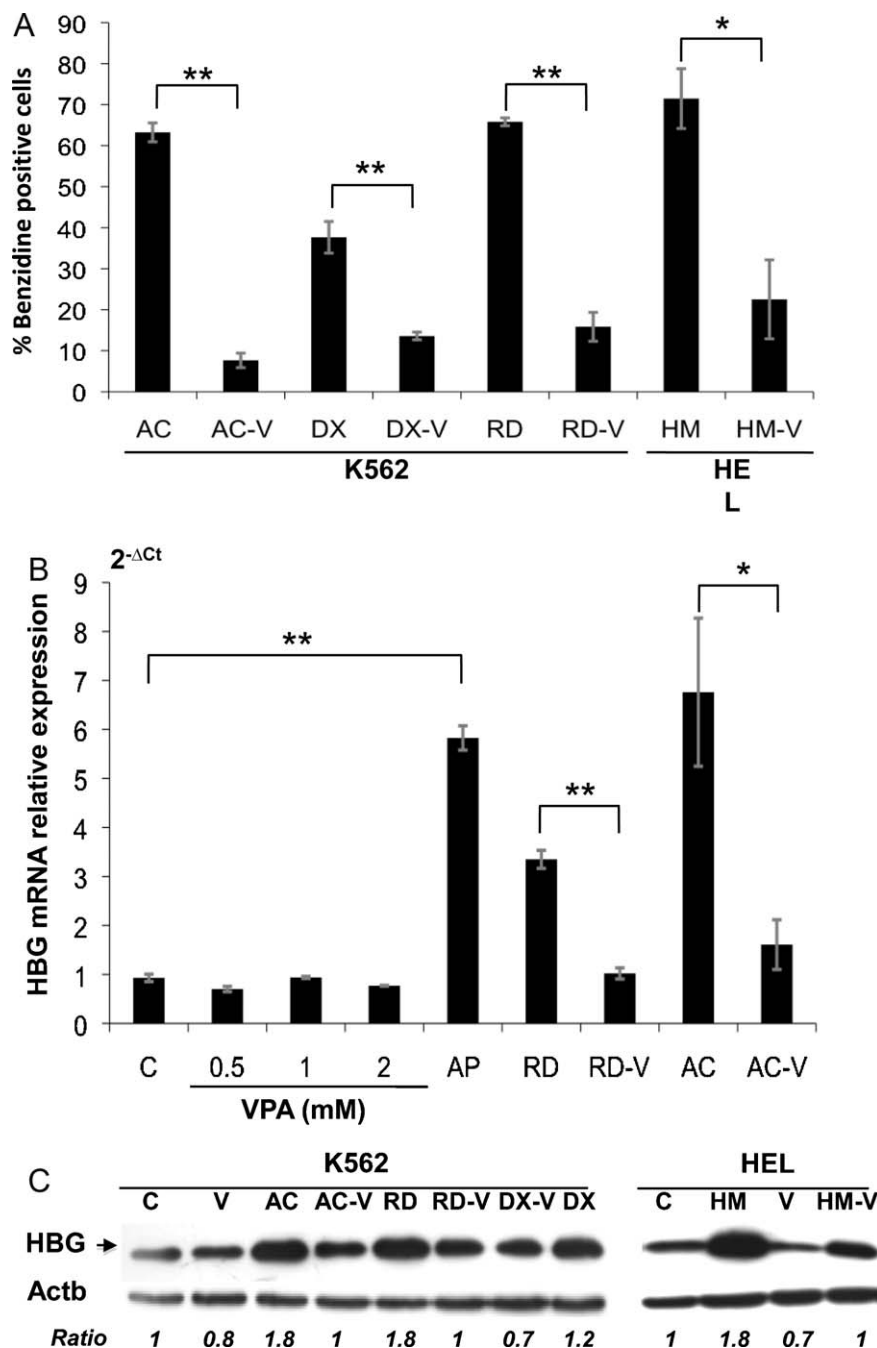


Fig. 2. VPA prevents hemoglobin production and HBG gene expression in K562 and HEL cells. K562 and HEL cells were induced to differentiate towards the erythroid pathway by aclacinomycin A (AC), doxorubicin (DX), radicicol (RD) or hemin (HM) in the presence or absence of 1 mM VPA (V) or with VPA alone at the indicated concentrations for 3 days. (A) Hemoglobin producing cells were identified and evaluated by benzidine staining ($n = 3$). (B) Real-time PCR analysis of globin-gamma (HBG) mRNA expression in K562 cells. The HDACi apicidin (AP) was used as a positive control for induction of erythroid differentiation ($n = 3$). (C) Western blot analysis of HBG protein expression in K562 and HEL cells (representative results of three independent experiments). Actin beta (Actb) was used as an internal control. Statistical significance levels * p -values < 0.05 ; ** p -values < 0.01 .

blot analysis showed that VPA reduced constitutive expression of GATA-1 in a concentration dependent manner. Moreover, 1 mM VPA inhibited the induction of GATA-1 expression in RD- and AC-treated K562 cells and HM-treated HEL cells after 3 days (Fig. 3A). Moreover, EMSA experiments showed a decrease in GATA-1 as well as NF-E2 binding activity (Fig. 3B) in the presence of 1 mM VPA. For GATA-1 EMSA, K562 and HEL cells were treated for 72 h and 24 h, respectively. In fact, GATA-1 expression and binding activity in HM-induced HEL cells (Fig. 3A, B), is in accordance with our

previous results in K562 cells that showed a transient induction of GATA-1 expression following 24 h of treatment and a decrease at days 2 and 3 [27]. The expression of the GATA-1 co-activators FOG1 and SP1 was also decreased in VPA-treated K562 cells as assessed by western blot analysis (Fig. 3C), and RD-induced over-expression of FOG1 and SP1 was also significantly prevented by VPA. Similarly, AC-induced SP1 expression was partially inhibited by VPA co-treatment. In contrast, expression of PU.1, which is a specific activator of the myelo-monocytic differentiation pathway as well as an inhibitor of

erythroid differentiation, was induced by 1 mM VPA as depicted in Fig. 3C. Moreover, RD inhibited PU.1 expression in K562 cells as we recently reported [25] and VPA totally abolished this inhibition.

3.7. GATA-1 transactivation activity is reduced in the presence of VPA

Considering that VPA modulated GATA-1 and co-factors expression, we assessed whether transactivation activity of

GATA-1 was affected. GATA-1 forced expression was performed in the human leukemia TF1 cell line by the GATA-1 expressing vector pXM-GATA1. TF1 cells were used as they exhibit a low basal expression level for GATA-1 when cultured in GM-CSF containing medium as shown in Fig. 3D, compared to differentiated cells in the presence of EPO. VPA 1 mM alone did not affect Luciferase expression from the reporter plasmid pGL3-GATA-Luc in accord with the low basal level of GATA-1 in GM-CSF cultured cells.

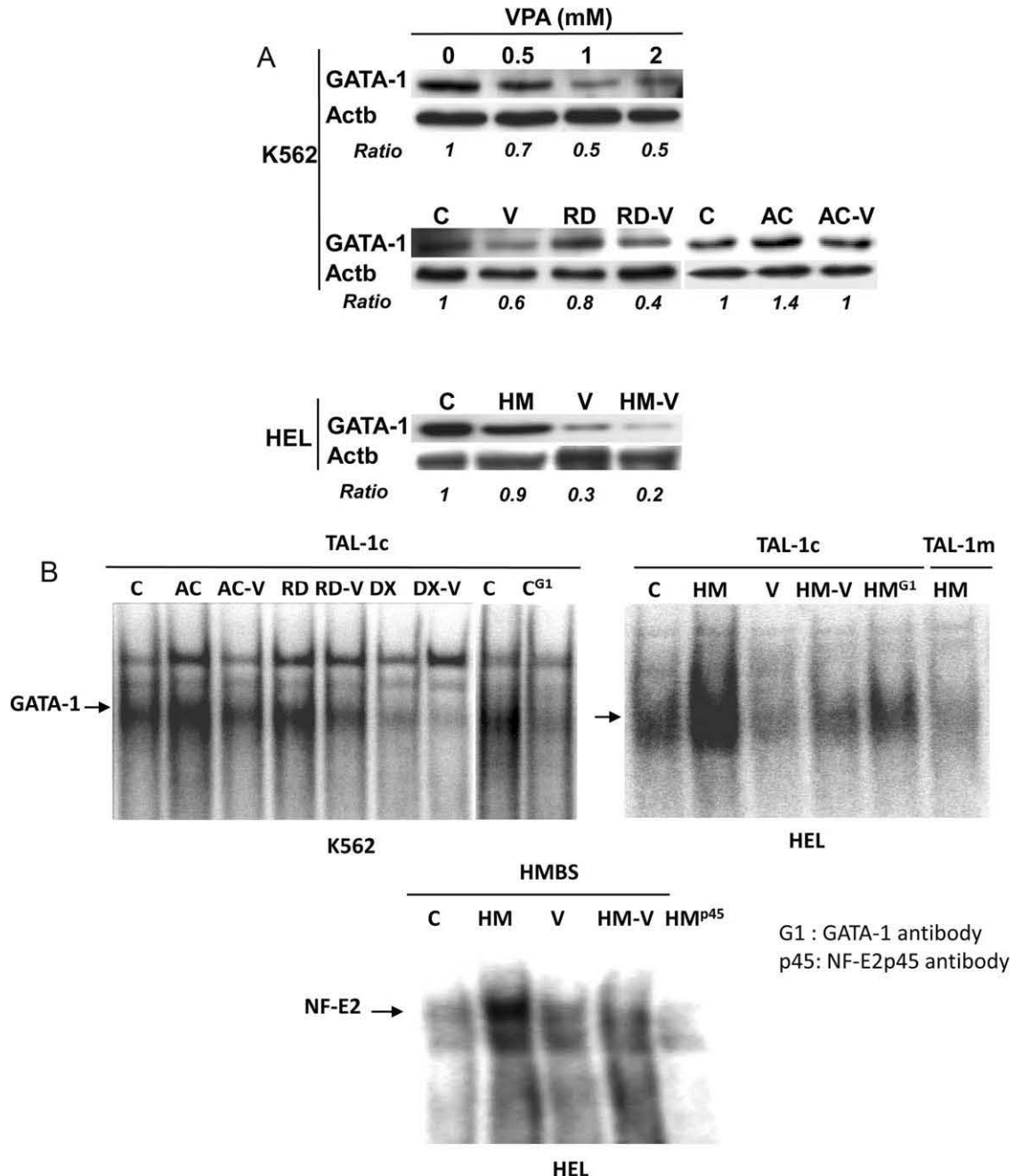


Fig. 3. VPA affects GATA-1 activity and cofactors expression. K562 and HEL cells were induced to differentiate towards the erythroid pathway by aclinomycin A (AC), doxorubicin (DX), radicicol (RD), or hemin (HM), in the presence or absence of 1 mM VPA (V) or with VPA alone at the indicated concentrations for 3 days. (C) represents the untreated cells. (A) Western blot analysis of GATA-1 protein expression (representative results of three independent experiments). (B) EMSA analysis of GATA-1 and NF-E2 binding activities using the TAL-1c (consensus) and the TAL-1m (mutated) oligonucleotide probes for GATA-1 and the HMBS probe for NF-E2. Immunodepletion experiments (C^{G1}, HM^{G1} and HM^{p45}) were performed using GATA-1 (G1) and NF-E2p45 (p45) antibodies. To observe an increase in GATA-1 binding activity in HM-induced HEL cells, day 1 nuclear protein extracts were used (representative results of three independent experiments). (C) Western blot analysis for expression of GATA-1 cofactors (FOG-1, PU.1 and SP1) in K562 cells (representative results of three independent experiment). Actin beta (Actb) was used as an internal control. (D) Co-transfected TF-1 cells with pXM-GATA1 (expressing GATA-1), pGL3-GATA-Luc (Luciferase expression, GATA-1 dependant) and phRL-SV40 (expressing Renilla, internal control), were treated with 1 mM VPA for 6 h prior to measurement of GATA-1 activity ($n = 3$); Western blot shows the low basal level of GATA-1 expression in TF-1 cells, which is significantly induced after Epo-treatment (representative results of three independent experiments). Statistical significance levels ** p -values < 0.01.

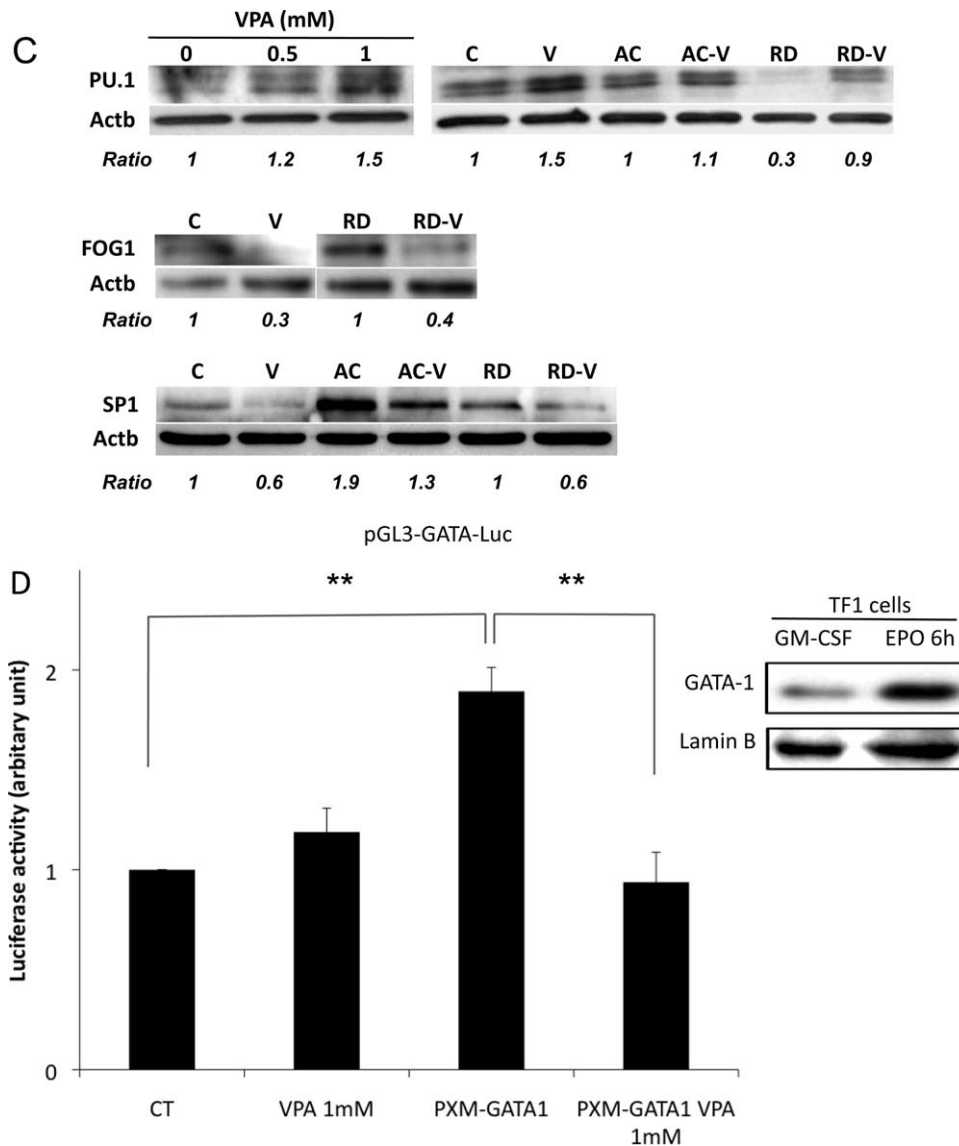


Fig. 3. (Continued).

However, VPA significantly reduced the Luciferase over-expression activated by exogenous GATA-1 (Fig. 3D) providing evidence that VPA directly affects GATA-1 transactivation activity.

3.8. VPA inhibits erythrocytic and induces monocytic features in CD34⁺ hematopoietic stem progenitor cells

CD34⁺ cells from cord blood were selected and cultured in the presence of erythropoietin (EPO) or thrombopoietin (TPO). Cells were treated with or without 1 mM VPA for 7 days. VPA did not induce significant changes in cell cycle or cell death of CD34⁺ cells (Figure S1B). This was in correlation with results showing that primary healthy cells are less sensitive to apoptosis induced by VPA compared to CLL or tumor cells [28,29]. In addition, the HDAC inhibiting activity of VPA has been confirmed by studying p21 gene expression in EPO and TPO co-treated cells (data not shown). Benzidine staining following a three-day VPA treatment showed a five-fold decrease in hemoglobin producing cells (Fig. 4A). In addition, VPA-mediated down-regulation of HBA and HMBS genes in EPO-induced CD34⁺ cells suggested its inhibitory effect on erythroid differentiation (Fig. 4B). Moreover VPA induced a significant decrease in the expression of CD235a in EPO-treated

cells (MFI: 0.38 ± 0.1) (Fig. 4C). These results were confirmed by performing fluorescence microscopy, targeting GPA/CD235a. GPA-positive HSPC disappeared in the presence of EPO when treated with VPA (Fig. 4D). The functional assay performed in semi-solid medium showed a decrease in the number of CFU by 50% in the presence of VPA. As a confirmation of VPA inhibiting effect on erythropoiesis, the proportion of CFU-E was significantly reduced (from 65.01% to 23.5%) by the treatment (Fig. 4E).

In contrast VPA induced a significant increase in the expression of genes belonging to the monocytic differentiation network, including CD11b (Fig. 4F), as observed in the results with cell lines (Fig. 1A). Flow cytometry results showed that VPA was able to induce CD11b expression in HSPC (MFI: 2.1 ± 0.19 and 1.54 ± 0.06 in co-treatment with EPO and TPO) (Fig. 4C) similarly to that observed in MEG01 and HL60 cells (Fig. 1A). To a lesser extent, we could detect an induction of thrombopoietic markers with an increase of CD41a (MFI: 1.2 ± 0.05) and CD61 (MFI: 1.2 ± 0.08) in co-treatment with EPO (Fig. 4C). In addition, we observed strong modifications of cell morphology (MGG staining) and a proportion of 40% cell adhesion for CD34⁺ cells and MEG01 cells (data not shown).

Altogether, the results were consistent with our microarray analysis and in particular with hematopoietic pathway-based

enrichment analysis (Table 1). This confirmed that VPA inhibits erythroid differentiation and activates the myelo-monocytic pathway.

4. Discussion

Microarray based gene expression profiling allowed us to obtain lists of genes induced and repressed by VPA on a kinetic scale including time points from 2 to 72 h. Enrichment analysis for GO BP, and MF terms revealed a large panel of topics related to cell differentiation including apoptosis, cell cycle, cytoskeleton, and more differentiation-specific GO terms including “myeloid leukocyte differentiation” and “erythrocyte homeostasis” among others. In a large scale meta-analysis of microarray gene expression

profiles it has been shown that cell lines in general display closer gene expression profiles to whole blood and leukemia samples compared to normal tissue and tumor tissue samples [30]. This underlines the validity of hematologic cell lines as models for hematopoiesis. Thus, to further characterize the suggested impact of VPA on hematopoiesis we used the chronic myelogenous leukemia cell line K562. This cell line is blocked in an early stage of hematopoietic differentiation. We tested for enrichment of markers and positive regulators of the erythro-, megakaryo-, granulo-, and monoopoietic lineages among the lists of up- and down-regulated genes by VPA treatment. This helped us to delineate on one side a potential stimulatory effect of VPA on monoipoiesis and on the other side an inhibitory effect on genes implicated in erythropoiesis in K562 cells. These effects implicate

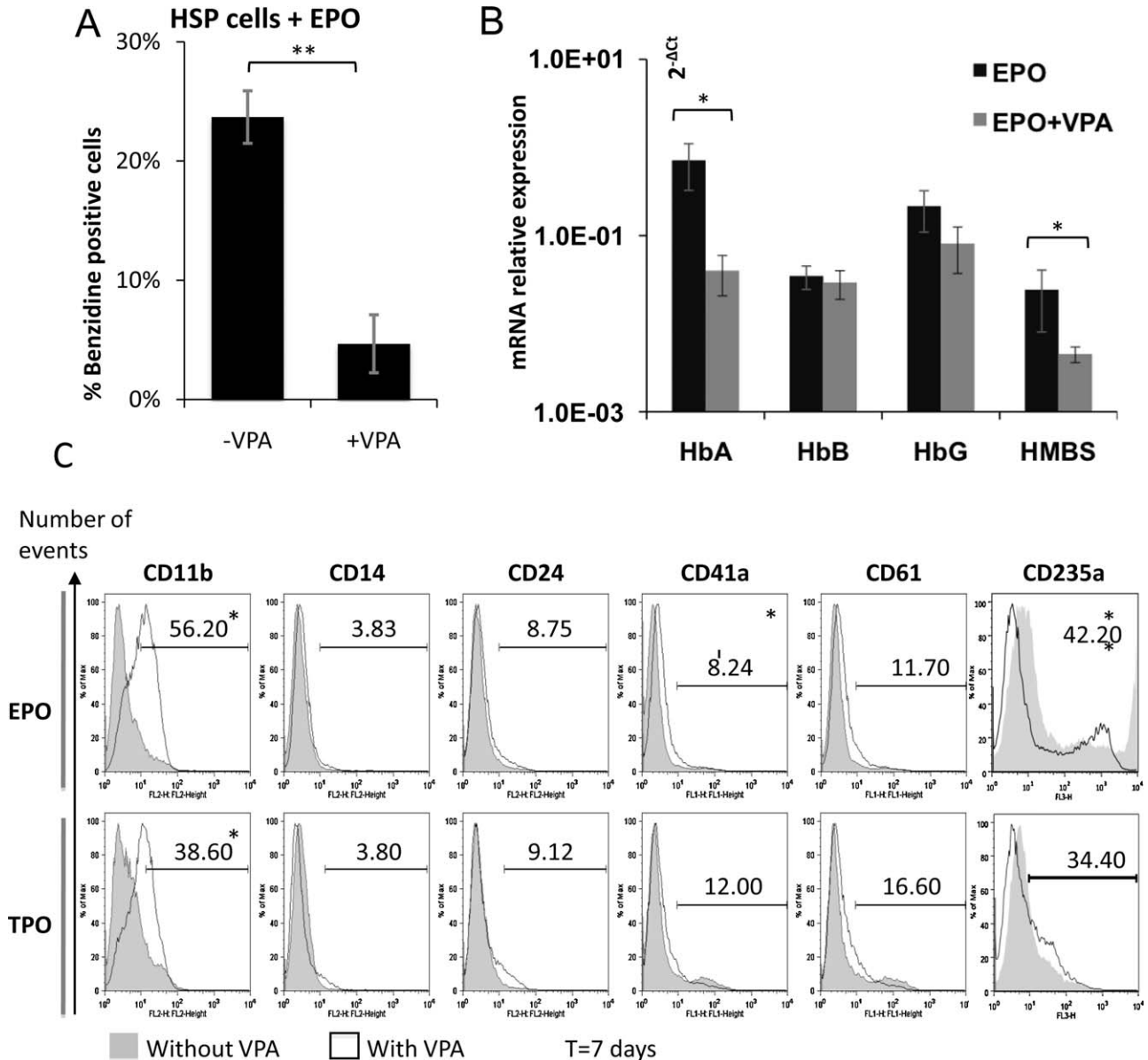


Fig. 4. Hematopoietic stem/progenitor CD34⁺ cells do not achieve erythroid development in the presence of VPA but undertake monocytic pathway. (A) Benzidine staining of EPO-induced CD34⁺ cells in the presence or the absence of 1 mM VPA ($n = 3$). (B) Real-time PCR analysis for erythroid genes expression during co-treatment with 1 mM VPA ($n = 5$). (C) Flow cytometry analysis of lineage-related markers on CD34⁺ cell surface after 7 days of culture in the presence of EPO or TPO and with (black line) or without (gray area) 1 mM VPA (EPO: $n = 4$; TPO: $n = 3$). (D) Evaluation of Glycophorin-A (in red) expression by fluorescence microscopy on K562 and HSP cells treated with 1 mM VPA (nuclear staining with Hoechst in blue). (E) Colony forming unit quantification and identification after 14 days of EPO treatment with or without VPA co-treatment (-E: erythrocytic; -GM: granulocytic-monocytic; -Meg: megakaryocytic) and cell pellets showing hemoglobinization (natural staining) of cells treated with EPO and co-treated or not with VPA from the semi-solid culture; $n = 3$. (F) Real-time PCR analysis of monocytic network gene expression, during treatment with EPO or TPO and co-treatment with VPA 1 mM (EPO: $n = 5$; TPO: $n = 3$). Statistical significance levels * -values < 0.05; ** -values < 0.01.

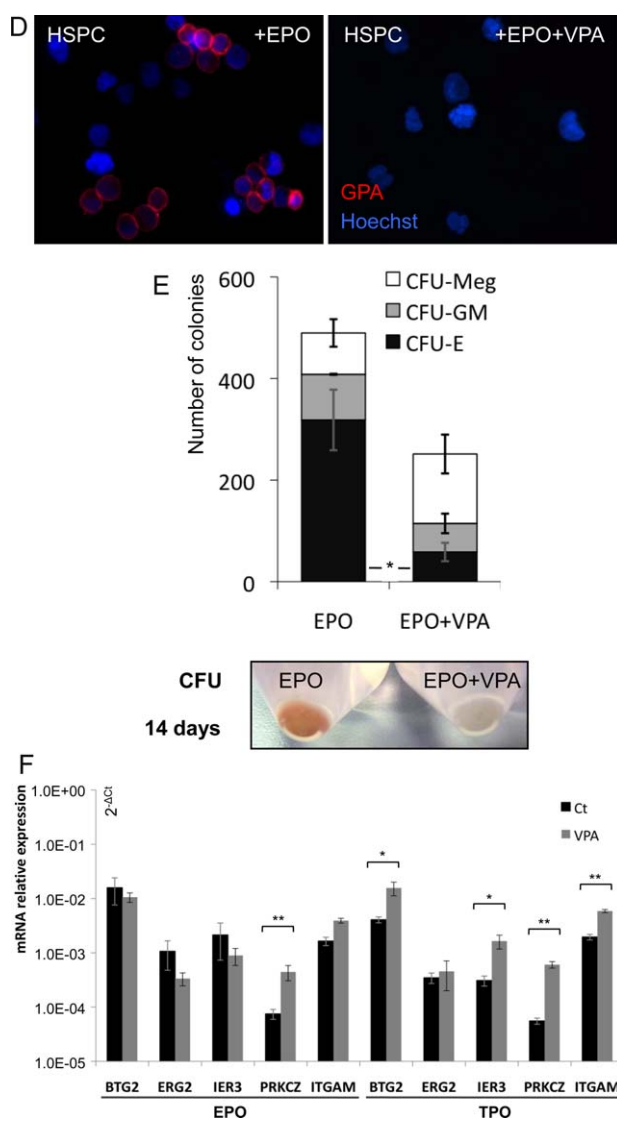


Fig. 4. (Continued).

the modulation of transcriptional regulators at early time points (2 and 6 h) as suggested by the results for GO BP and MF enrichment analysis (Tables S7 and S8). Taken together these results indicate that VPA is able to modulate hematopoiesis by affecting transcriptional regulators at early time points.

In addition to the analysis for the effects of VPA on H3 and H4 acetylation and p21 gene expression, its inhibitory activity on HDACs was confirmed by comparing our lists of differentially expressed genes to a “core set of HDACi regulated genes” as previously described [31]. It was reported that a common set of genes is regulated by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), trichostatin A (TSA) and MS-275 in human breast and bladder carcinoma cell lines. Among the up-regulated core set genes, 6 out of 8 showed an identical differential expression pattern compared to VPA treatment in K562 cells. These were CDKN1A, DHRS2, FUCA1, CLU, GLRX and MT1X. For the down-regulated core set genes there were 3 out of 5 genes with an identical regulatory pattern, namely HDGF, ANP32B and CTPS. The effects of HDACi on cell cycle, apoptosis [32], cytoskeleton [33] and hematopoiesis [34,35], have already been described in the literature and strongly depend on the cell type, the compound, and the experimental conditions used [36]. Sodium butyrate, TSA, SAHA, HC-toxin, MS-

275 and apicidin (AP) as well as VPA [6,37] were reported as erythroid differentiation inducers [38]. However, hemoglobin production in VPA-treated cells remained much lower than that described for other classes of differentiating agents including AC, DX, RD, and HM or different HDACi [6], whose activity spectrum on HDACs are distinct from VPA. Moreover, in a comparative study of ten VPA derivatives only one induced hemoglobin production in K562 cells in a similar way to butyric acid [37]. These data showed the low efficiency of VPA as an inducer of erythroid differentiation *in vitro*. Studies have even reported adverse effects of VPA on erythropoiesis. Handoko et al. pointed out the risk of aplastic anemia in patients treated with antiepileptic drugs [8]. They especially reported that the use of carbamazepine and VPA was significantly associated with aplastic anemia in their study. In addition, The et al. reported one case of persistent suppression of erythropoietic elements in a patient with prolonged treatment of VPA after discontinuing carbamazepine treatment [10]. Previous reports describing the hematological toxicity of anticonvulsive drugs [8,9,39] showed pure red cell aplasia associated with VPA therapy. Moreover, it was recently shown that VPA represses CFU-E development and promotes GM-colony formation [40]. It is not yet clear if VPA-mediated inhibition of HDACs is involved in erythroid gene down-regulation.

In this study, VPA induced a decrease in hemoglobin producing cells and globin gene expression in K562, HEL, and CD34⁺ HSPC, a decrease of CFU-E in the semi-solid medium functional assay and a decrease of the expression of CD235a/GPA in MEG01 and HSPC. This was in agreement with the analysis of TF expression involved in erythropoiesis. Down-regulation of FOG1 as well as SP1 in VPA-treated K562 cells corroborated the inhibiting effect of VPA on erythroid differentiation. Furthermore, expression of the GATA-1 inhibitor PU.1 was markedly increased. This supports both the inhibition of erythroid differentiation and the induction of granulo-monocytic differentiation. This later point was validated by analysis of specific markers in MEG01 and HL60 cells as well as in CD34⁺ cells. VPA has been shown to induce myeloid specific markers in U937 leukemia cell line as well as in HL-60 cells and human primary acute myeloid leukemia cells [41]. Additionally early megakaryocytic markers were induced in UT-7 cells [35].

ORA for hematopoietic differentiation-related TFBS motifs revealed motifs associated with CEBPA, as well as AP-1 and GATA family members, among others. Here it is important to point out that AP-1 motifs are only significantly associated with the lists of up-regulated genes over the whole time scale and no significant association with the lists of repressed genes was detected at any time point. Furthermore, different members of the AP-1 family, including JUN, JUNB, JUND and FOS were also significantly induced over the whole time scale (Table S6). The positive effect of the AP-1 TF family members on monopoiesis has already been described in the literature [42]. For the CEBPA binding sites we observed a significant association of CEBPA-related PWMs to the lists of differentially expressed genes over the whole time scale. Microarray analysis revealed a significant induction of CEBPA at time points 6 and 10 h. CEBPA is required in the commitment to granulocyte–monocyte progenitor cells and regulates PU.1 gene transcription [43], whose protein was found over-expressed in VPA-treated K562 cells. CEBPA favors monocytic lineage commitment in primary myeloid progenitor cells [44], and it has been shown to inhibit cell cycle transition in different phases including G1 to S in the myeloid lineage and G0 to G1 in different breast cancer cell lines [45]. This effect may be mediated by the induction of cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A) [46]. A recent study has shown that CEBPA:JUN and CEBPA:FOS heterodimerization plays an important role in monocyte lineage commitment [47]. Considering the GATA-1 and -2 binding sites, the corresponding PWMs showed significant associations with the lists of up- and

or down-regulated genes for the time points from 6 to 72 h, while for time point 2 h a significant enrichment was only detected for the negative gene list. GATA-1 and GATA-2 are essential TFs for normal blood cell maturation. GATA-1 is implicated in the differentiation of erythrocytes, mast cells, eosinophils and megakaryocytes [48], while GATA-2 is required for the proliferation of early hematopoietic cells as well as for megakaryocyte and mast cell development [49]. Expression of GATA-2 precedes that of GATA-1 and its expression must decrease as GATA-1 expression increases to enable erythropoiesis [48].

Here it is important to point out that over-representation for a TFBS motif could correspond to a modulation of transactivational activity for a distinct TF than initially used to create the corresponding PWM. Additionally, it is not possible to clearly delineate the functional role of a TF as the corresponding binding sites might act as transcriptional activator or repressor sites. So it was important to delineate the functional role for the TFs corresponding to the TFBS motifs by EMSA and reporter gene transfection assays, in particular for the key transcription factor GATA-1. Altogether, these results suggest a stimulation of mono-poietic lineage commitment and confirm a repression of erythrocytic lineage commitment by VPA as assessed by microarray experiments on K562 cells and validated on other hematopoietic cell lines as well as hematopoietic progenitor cells. This process involves well-known transcriptional regulators of hematopoiesis, including amongst others AP-1 and CEBPA family members as well as GATA-1 and its co-factors FOG1, SP1 and PU.1.

According to the incidence of cancer-associated anemia (30%), our results together with VPA-related clinical observations support the necessity to take into consideration the effect of VPA on erythropoiesis, especially in the case of its potential application in cancer therapy.

Conflict of interest

The authors have no conflicting financial interests.

Acknowledgements

SC, SE, MS are supported by Télévie fellowships and CG by a PhD grant of the Fonds National pour la Recherche, Luxembourg. Research is supported by Télévie, “Fondation de Recherche Cancer et Sang”, “Recherches Scientifiques Luxembourg”, “Een Häerz fir Kriibskrank Kanner” and Action Lions “Vaincre le Cancer”. Print costs were covered by the Fonds National de la Recherche Luxembourg.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bcp.2010.11.011.

References

- Michaelis M, Michaelis UR, Fleming I, Suhan T, Cinatl J, Blaheta RA, et al. Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Mol Pharmacol* 2004;65:520–7.
- Blaheta RA, Cinatl Jr J. Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. *Med Res Rev* 2002;22:492–511.
- Tang R, Faussat AM, Majdak P, Perrot JY, Chaoui D, Legrand O, et al. Valproic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells expressing P-gp and MRP1. *Leukemia* 2004;18:1246–51.
- Blaheta RA, Michaelis M, Driever PH, Cinatl Jr J. Evolving anticancer drug valproic acid: insights into the mechanism and clinical studies. *Med Res Rev* 2005;25:383–97.
- Facchetti F, Previdi S, Ballarini M, Minucci S, Perego P, La Porta CA. Modulation of pro- and anti-apoptotic factors in human melanoma cells exposed to histone deacetylase inhibitors. *Apoptosis* 2004;9:573–82.
- Gurvich N, Tsygankova OM, Meinkoth JL, Klein PS. Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Res* 2004;64:1079–86.
- Kieslich M, Schwabe D, Cinatl Jr J, Driever PH. Increase of fetal hemoglobin synthesis indicating differentiation induction in children receiving valproic acid. *Pediatr Hematol Oncol* 2003;20:15–22.
- Handoko KB, Souverein PC, van Staa TP, Meyboom RH, Leufkens HG, Egberts TC, et al. Risk of aplastic anemia in patients using antiepileptic drugs. *Epilepsia* 2006;47:1232–6.
- Farkas V, Szabo M, Renyi I, Kohlheb O, Benninger C. Temporary pure red-cell aplasia during valproate monotherapy: clinical observations and spectral electroencephalographic aspects. *J Child Neurol* 2000;15:485–7.
- The T, Kolla R, Dawkins F, Truth AJ. Pure red cell aplasia after 13 years of sodium valproate, and bone marrow suppression after 17 years of carbamazepine. *PLoS Med* 2004;1:e51.
- Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J Biomed Biotechnol* 2010.
- Tsang AP, Visvader JE, Turner CA, Fujiwara Y, Yu C, Weiss MJ, et al. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* 1997;90:109–19.
- Merika M, Orkin SH. Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol Cell Biol* 1995;15:2437–47.
- Ikonomi P, Rivera CE, Riordan M, Washington G, Schechter AN, Noguchi CT. Overexpression of GATA-2 inhibits erythroid and promotes megakaryocyte differentiation. *Exp Hematol* 2000;28:1423–31.
- Stopka T, Amanatullah DF, Papetti M, Skoultchi AI. PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure. *EMBO J* 2005;24:3712–23.
- Friedman AD. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 2007;26:6816–28.
- Kummalu T, Friedman AD. Cross-talk between regulators of myeloid development: C/EBPalpha binds and activates the promoter of the PU.1 gene. *J Leukoc Biol* 2003;74:464–70.
- Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1975;45:321–34.
- Morceau F, Dupont C, Palissot V, Borde-Chiche P, Trentesaux C, Dicato M, et al. GTP-mediated differentiation of the human K562 cell line: transient overexpression of GATA-1 and stabilization of the gamma-globin mRNA. *Leukemia* 2000;14:1589–97.
- Falcon S, Gentleman R. Using GOSTats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics* 2007;23:257–8.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000;25:25–9.
- R Development Core Team. A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2007.
- Frith MC, Fu Y, Yu L, Chen JF, Hansen U, Weng Z. Detection of functional DNA motifs via statistical over-representation. *Nucleic Acids Res* 2004;32:1372–81.
- Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 2008;132:631–44.
- Morceau F, Buck I, Dicato M, Diederich M. Radicicol-mediated inhibition of Bcr-Abl in K562 cells induced p38-MAPK dependent erythroid differentiation and PU.1 down-regulation. *Biofactors* 2008;34:313–29.
- Morceau F, Chenais B, Gillet R, Jardillier JC, Jeannesson P, Trentesaux C. Transcriptional and posttranscriptional regulation of erythroid gene expression in anthracycline-induced differentiation of human erythroleukemic cells. *Cell Growth Differ* 1996;7:1023–9.
- Schnekenburger M, Morceau F, Duvoix A, Delhalle S, Trentesaux C, Dicato M, et al. Increased glutathione S-transferase P1-1 expression by mRNA stabilization in hemin-induced differentiation of K562 cells. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1269–77.
- Armeanu S, Pathil A, Venturelli S, Mascagni P, Weiss TS, Gottlicher M, et al. Apoptosis in hepatoma cells but not on primary hepatocytes by histone deacetylase inhibitors valproate and ITF2357. *J Hepatol* 2005;42:210–7.
- Bokelmann I, Mahlknecht U. Valproic acid sensitizes chronic lymphocytic leukemia cells to apoptosis and restores the balance between pro- and antiapoptotic proteins. *Mol Med* 2008;14:20–7.
- Sandberg R, Ernberg I. The molecular portrait of in vitro growth by meta-analysis of gene-expression profiles. *Genome Biol* 2005;6:R65.
- Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG, Davidsen SK. Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2003;2:151–63.
- Catalano MG, Fortunati N, Pugliese M, Costantino L, Poli R, Bosco O, et al. Valproic acid induces apoptosis and cell cycle arrest in poorly differentiated thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1383–9.
- Walmod PS, Skladchikova G, Kawa A, Berezin V, Bock E. Antiepileptic teratogen valproic acid (VPA) modulates organisation and dynamics of the actin cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton* 1999;42:241–55.
- Cao H, Stamatoyannopoulos G. Histone deacetylase inhibitor FK228 is a potent inducer of human fetal hemoglobin. *Am J Hematol* 2006;81:981–3.
- Vulcano F, Ciccarelli C, Mattia G, Marampon F, Giampiero M, Milazzo L, et al. HDAC inhibition is associated to valproic acid induction of early megakaryocytic markers. *Exp Cell Res* 2006;312:1590–7.

- [36] Balasubramanian S, Verner E, Buggy JJ. Isoform-specific histone deacetylase inhibitors: the next step? *Cancer Lett* 2009;280:211–21.
- [37] Deubzer H, Busche B, Ronndahl G, Eikel D, Michaelis M, Cinatl J, et al. Novel valproic acid derivatives with potent differentiation-inducing activity in myeloid leukemia cells. *Leuk Res* 2006;30:1167–75.
- [38] Witt O, Monkemeyer S, Ronndahl G, Erdlenbruch B, Reinhardt D, Kanbach K, et al. Induction of fetal hemoglobin expression by the histone deacetylase inhibitor apicidin. *Blood* 2003;101:2001–7.
- [39] MacDougall LG. Pure red cell aplasia associated with sodium valproate therapy. *J Am Med Assoc* 1982;247:53–4.
- [40] Bartels M, Geest CR, Bierings M, Buitenhuis M, Coffey PJ. Histone deacetylase inhibition modulates cell fate decisions during myeloid differentiation. *Haematologica* 2010;95:1052–60.
- [41] Cheng YC, Lin H, Huang MJ, Chow JM, Lin S, Liu HE. Downregulation of c-Myc is critical for valproic acid-induced growth arrest and myeloid differentiation of acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2007;31:1403–11.
- [42] Szabo E, Preis LH, Birrer MJ. Constitutive cjun expression induces partial macrophage differentiation in U-937 cells. *Cell Growth Differ* 1994;5:439–46.
- [43] Wang X, Scott E, Sawyers CL, Friedman AD. C/EBPalpha bypasses granulocyte colony-stimulating factor signals to rapidly induce PU.1 gene expression, stimulate granulocytic differentiation, and limit proliferation in 32D cl3 myeloblasts. *Blood* 1999;94:560–71.
- [44] Wang D, D'Costa J, Civin CI, Friedman AD. C/EBPalpha directs monocytic commitment of primary myeloid progenitors. *Blood* 2006;108:1223–9.
- [45] Gery S, Tanosaki S, Bose S, Bose N, Vadgama J, Koeffler HP. Down-regulation and growth inhibitory role of C/EBPalpha in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:3184–90.
- [46] Johnson PF. Molecular stop signs: regulation of cell-cycle arrest by C/EBP transcription factors. *J Cell Sci* 2005;118:2545–55.
- [47] Cai DH, Wang D, Keefer J, Yeaman C, Hensley K, Friedman AD. C/EBP alpha:AP-1 leucine zipper heterodimers bind novel DNA elements, activate the PU.1 promoter and direct monocyte lineage commitment more potently than C/EBP alpha homodimers or AP-1. *Oncogene* 2008;27:2772–9.
- [48] Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 2005;25:1215–27.
- [49] Tsai FY, Orkin SH. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* 1997;89:3636–43.

RESUME

Les anémies liées au cancer et aux inflammations chroniques sont suspectées d'être provoquées par la libération de la cytokine pro-inflammatoire, le «tumor necrosis factor» (TNF)- α . Il a été décrit comme un inhibiteur potentiel de la production de l'érythropoïétine (Epo) au niveau du rein, conduisant à une diminution de l'érythropoïèse. Cependant, des études *in vitro* ont suggéré que le TNF α pouvait agir directement sur les cellules érythroblastiques.

Des études réalisées au laboratoire LBMCC sur des lignées érythroleucémiques humaines ont montré que le TNF α limite la surexpression de gènes érythroïde-spécifiques en corrélation à l'inhibition du facteur de transcription GATA-1.

Afin d'étudier l'effet inhibiteur du TNF α sur l'induction de l'érythropoïèse par l'Epo, nous avons utilisé des cellules souches hématopoïétiques CD34+ comme modèle. Dans notre système de culture *in vitro*, nous avons pu reproduire les différents stades de l'érythropoïèse en présence d'Epo, permettant ainsi d'étudier l'effet du TNF α sur cette voie. L'étude de la production d'hémoglobine, de la morphologie cellulaire et l'analyse des marqueurs membranaires spécifiques, a montré que le TNF α réduit la capacité de l'Epo à engager les cellules vers une différenciation érythroïde terminale. Au niveau moléculaire, nous avons corrélié cet effet à la réduction de l'expression de gènes érythroïdes. De plus, il réduit l'activité trans-activatrice du facteur de transcription GATA-1 et induit son interaction avec le facteur PU.1 *via* l'activation de la protéine p38MAPK. Enfin, l'expression du facteur GATA-2 est induite et la balance GATA-1/GATA-2 est en partie perturbée par l'inhibition des miR 144/451 par le TNF α .

Mots clés : TNF α , inflammation, cancer, anémie, différenciation

ABSTRACT

Cancer-related anemia is thought to be mediated by the release of tumor necrosis factor (TNF α). TNF α is one of the major mediators of inflammation and has been linked to the inhibition of the erythropoietin (Epo) production from kidney, leading thus to anemia. However, the inhibitory effect of TNF α on erythroblast differentiation has been suggested by several *in vitro* studies.

Previous results from the LBMCC lab on human leukemia cell lines showed that TNF α prevents over-expression of erythroid-specific genes in human erythroleukemia cell lines. In all cases, the inhibitory effect of TNF α was in correlation with the inhibition of the erythroid key transcription factor, GATA-1.

In order to study the inhibitory effect of TNF α on the Epo-mediated erythropoiesis, we used CD34+ hematopoietic stem cells (HSC) as a model. In our *in vitro* model, we reproduced different stages of erythropoiesis, allowing us to use this model for the study of TNF α and the erythroid lineage. The study of hemoglobin production, the cell morphology and the analysis of specific erythroid membrane markers, have shown the limited capacity of Epo to stimulate HSC erythroid differentiation under TNF α treatment. At the molecular level, we have correlated this effect to the reduced expression of erythroid-specific genes. Moreover, TNF α reduces the transcriptional activity of GATA-1 and induces its interaction with PU.1 *via* p38MAPK activation. Furthermore, GATA-2 expression is increased and the GATA-1/GATA-2 balance, which is critical for erythropoiesis, is partially disturbed by 144/451 miRs inhibition from TNF α .

Keywords: TNF α , inflammation, cancer, anemia, differentiation