HAL
open science

Effet de l'acide valproïque sur l'hématopoïèse : rôle du réseau de régulation "microARN/ facteurs de transcription"

Anne Trécul

▶ **To cite this version:**

Anne Trécul. Effet de l'acide valproïque sur l'hématopoïèse : rôle du réseau de régulation "microARN/ facteurs de transcription". Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0143 . tel-01751002

HAL Id: tel-01751002

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751002v1

Submitted on 29 Mar 2018

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE
Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Anne TRECUL

Effet de l'acide valproïque sur l'hématopoïèse : rôle du réseau de régulation "microARN / Facteurs de transcription"

29 Septembre 2014

Membres du jury

Rapporteurs :

Mme VAN LINT Carine	Professeur, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, Belgique
M. DEMOULIN Jean-Baptiste	Professeur, Institut de Duve, Bruxelles, Belgique

Examinateurs :

Mme LAPILLONNE Hélène	Docteur, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France
M. MERLIN Jean-Louis	Professeur, Université de Lorraine, Nancy, France
M. DICATO Mario	Professeur, Centre Hospitalier de Luxembourg, Luxembourg
M. DIEDERICH Marc	Professeur, LBMCC, Luxembourg, Luxembourg, Directeur de thèse
M. MORCEAU Franck	Docteur, LBMCC, Luxembourg, Luxembourg, Co-Directeur de thèse

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer
9 rue Edward Steichen L-2540 Luxembourg

A l'issue de la rédaction de cette recherche, je tiens à dire un grand Merci à toutes les personnes qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) à Luxembourg. Durant toute ma thèse, j'ai bénéficié d'une bourse Télévie et sans cette aide financière, ce travail n'aurait pas pu aboutir. Je tiens donc à remercier sincèrement le Télévie d'avoir soutenu mon projet de recherche. J'exprime également toute ma reconnaissance au professeur Dicato pour m'avoir permis de travailler sous un contrat de la fondation « Recherche Cancer et Sang » dont il est le président.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au professeur Marc Diederich qui m'a permis de réaliser ma thèse au sein du laboratoire LBMCC. Marc fut pour moi un directeur de thèse attentif et disponible malgré ses nombreuses charges. Sa compétence et sa rigueur scientifique m'ont beaucoup appris et resteront présents dans mon esprit dans mon futur travail de chercheur.

Je souhaite également remercier fortement le docteur Franck Morceau de m'avoir accueillie dans son équipe de recherche « différenciation » et d'avoir su me faire confiance en acceptant d'encadrer mon travail doctoral. J'ai été extrêmement sensible aux qualités humaines d'écoute de Franck et à sa grande disponibilité. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié ses multiples conseils et toutes les heures qu'il a consacrées lors des discussions instructives qui m'ont permis d'apprendre beaucoup de choses et d'évoluer dans mon travail de chercheur.

Je remercie les professeurs Jean-Baptiste Demoulin et Jean-Louis Merlin de m'avoir suivi tout au long de ma thèse notamment lors des comités de thèse qui se sont toujours déroulés dans la bonne humeur et avec beaucoup de gentillesse. Leurs commentaires avisés ont été pour moi très constructifs pour mon travail.
En plus de Jean-Baptiste Demoulin et Jean-Louis Merlin, je tiens à remercier le professeur Carine Van Lint et le docteur Hélène Lapillonne qui m'ont fait l'honneur de participer au jury de soutenance. J'adresse ma gratitude aux professeurs Jean-Baptiste Demoulin et Carine Van Lint qui ont accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Vos remarques, vos conseils et vos critiques seront les dernières pierres apportées à ce travail.

Je remercie aussi le personnel de la Maternité (clinique Dr Bohler) pour sa collaboration. Sans tous ces sangs de cordons, je n'aurais pas pu réaliser une partie de mon travail. Merci à toutes les femmes et couples qui ont accepté de faire don de leur sang de cordon.

J'exprime mes remerciements à toutes les personnes que j'ai appris à connaître au sein du LBMCC : Marie-Hélène, Anthoula, Sébastien, Michaël, Cristina, Flavia, Claudia, François, Richard et Laurent.
Et je remercie encore plus particulièrement :
Florian, pour tous les bons moments passés ensemble à rigoler de tes petites blagounettes.
Cindy, notre « mère » pour tous les bébés thésards. Merci Cindy tu es une personne qui a toujours été chaleureuse, qui m'a prodigué maints conseils que ce soit professionnellement, comme personnellement. Ca a toujours été un plaisir de passer du temps avec toi.
Marion, mon petit « poulain », tu es la première personne que j'ai encadré à la paillasse, ça restera mémorable pour moi. Un grand merci pour ton aide, ton soutien et ta bonne humeur dans notre salle « différenciation ». Je tenais également à te remercier pour tous les bons moments passés au petit déj les vendredi matins.
Mention spéciale à ma petite colloc, Carole, qui m'a supportée et soutenue pendant mes périodes de doutes, encouragé à ne jamais baisser les bras et je t'en remercie car ton soutien au quotidien est en partie responsable de l'aboutissement et de la réussite de cette thèse. Un grand merci à mon amie, colloc, collègue,… que j'aime beaucoup.

Je tiens à exprimer tout mon amour à mes parents, François et Marie Catherine et à mes petites sœurs Hélène et Elise, qui ont toujours cru en moi et qui ont su me donner confiance. Vos encouragements et votre soutien sont les mots clés qui m'ont permis de réussir et je suis fière aujourd'hui, de vous présenter l'aboutissement de mon travail.

Comme on dit, « le meilleur pour la fin », je tiens à remercier Romain qui m'a suivi, soutenu, encouragé,… tout au long de ma thèse. Merci d'avoir été là, même loin de moi, tu as toujours réussi à me faire oublier les moments difficiles de la thèse. Tu as connu les premiers pas de mon aventure et aujourd'hui, je souhaite m'envoler avec toi vers de nouveaux horizons.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés

au « Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer »

à l'Hôpital Kirchberg, Luxembourg

Ce travail n'aurait pu aboutir sans le soutien financier :

du « Télévie Luxembourg » (bourse de formation-recherche Télévie),

de la Fondation « Recherche Cancer et Sang (FRCS) »,

de l'Association « Recherches Scientifiques Luxembourg (RSL) »

et

de l'Association « Een Häerz fir kriibskrank Kanner

(Un cœur pour les enfants atteints d'un cancer) »

Publications liées à cette thèse

Travail original :

Biochem Pharmacol. 2014, volume 92, Issue 2, pp 299-331

Valproic acid regulates erythro-megakaryocytic differentiation through modulation of transcription factors and microRNAs regulatory micro-networks

Anne Trécul, Franck Morceau, Anthoula Gaigneaux, Michael Schnekenburger, Mario Dicato and Marc Diederich

PMID : 25241289

Autres publications

Travail original :

Cancer Lett. 2013, volume 340, Issue 1, pp 30-42

Polyphenol tri-vanillic ester 13c inhibits P-JAK2V617F and Bcr-Abl oncokinase expression in correlation with STAT3/STAT5 inactivation and apoptosis induction in human leukemia cells

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

PMID : 23811288

Revue :

Genes Nut. 2012, volume 7, Issue 2, pp 111-125

Dietary compounds as potent inhibitors of the signal transducers and activators of transcription (STAT) 3 regulatory network

Trécul A, Morceau F, Dicato M, Diederich M

PMID : 22274779

Ces publications sont annexées à la fin du document.

SOMMAIRE

1 INTRODUCTION 1

1.1 L'HEMATOPOÏESE 1

1.2 L'ERYTHROPOÏESE ET LA MEGACARYOPOÏESE DERIVENT D'UN PROGENITEUR COMMUN 9

1.2.1 L'Erythropoïèse 9

1.2.2 La mégacaryopoïèse 19

1.2.3 La régulation de la différenciation érythro/mégacaryocytaire au niveau moléculaire 24

1.2.3.1 Les facteurs de transcription 24

1.2.3.2 Les microARN 33

1.3 LA REGULATION EPIGENETIQUE DE L'EXPRESSION DES GENES PAR LES HDAC 44

1.3.1 L'acétylation des histones 44

1.3.1.1 La chromatine 44

1.3.1.2 Les modifications post-traductionnelles des histones 48

1.3.1.3 Implication des histones désacétylases dans la regulation l'hématopoïèse 52

1.3.1.4 Autres rôles des HAT et des HDAC 53

1.3.2 Les inhibiteurs d'HDAC 53

1.4 L'ACIDE VALPROÏQUE 55

1.4.1 Un agent anti-convulsant 55

1.4.2 Un modulateur épigénétique 57

1.4.3 L'acide valproïque comme anticancéreux 58

1.4.4 Les effets secondaires de l'acide valproïque 59

2 OBJECTIFS DU TRAVAIL 62

2.1 OBJECTIF GENERAL 62

2.2 OBJECTIFS SPECIFIQUES 62

3 MATERIELS ET METHODES 65

3.1 ISOLEMENT ET PURIFICATION DES CELLULES CD34$^+$ 65

3.2 CULTURE CELLULAIRE 65

3.3 TEST A LA BENZIDINE 69

3.4 CYTOMETRIE DE FLUX 69

3.5 EXTRACTION DES PROTEINES TOTALES 70

3.6 EXTRACTION DES PROTEINES NUCLEAIRES ET CYTOPLASMIQUES 70

3.7 EXTRACTION ACIDE DES PROTEINES 74

3.8 DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE BRADFORD 74

3.9 ANALYSE DE L'EXPRESSION DES PROTEINES PAR WESTERN BLOT 74

3.10 IMMUNOPRECIPITATION PROTEIQUE 77
3.11 EXTRACTION DES ARN TOTAUX 79
3.12 TRANSCRIPTION INVERSE 79
3.13 LA TRANSCRIPTION INVERSE DES MICROARN 79
3.14 PCR EN TEMPS REEL 80
3.15 COLORATION DE MAY-GRÜNWALD GIEMSA (MGG) 83
3.16 STATISTIQUES 83

4 RESULTATS 85

4.1 EFFET DE L'ACIDE VALPROÏQUE SUR L'ERYTHROPOÏESE, AU NIVEAU CELLULAIRE 85
4.1.1 Effet de l'acide valproïque sur la différenciation des cellules TF1 85
4.1.2 Effet de l'acide valproïque sur la différenciation des cellules CD34+ 89
4.2 EFFET DE L'ACIDE VALPROÏQUE SUR L'ERYTHROPOÏESE, AU NIVEAU MOLECULAIRE 93
4.2.1 L'acide valproïque module l'expression des miR impliqués dans l'érythropoïèse 93
4.2.2 L'acide valproïque diminue la transcription des miR-144/451, en corrélation avec l'inhibition de la différenciation érythroïde et la diminution de l'expression de GATA-1 98
4.2.3 L'acide valproïque inhibe l'expression des miR-144/451 et augmente l'interaction entre GATA-1 et PU.1 dans les cellules CD34+ 106
4.2.4 L'inhibition du miR-451 contribue au blocage de la différenciation érythroïde induite par l'acide valproïque 111
4.3 IMPLICATION DE L'ACTIVITE INHIBITRICE DES HDAC DU VPA, DANS L'INHIBITION DE L'ERYTHROPOÏESE 117
4.3.1 Effet du valpromide et du MS-275 sur la viabilité et la prolifération des cellules TF1 117
4.3.2 Effet de l'acide valproïque, du MS-275 et du valpromide sur l'acétylation des histones 120
4.3.3 Rôle du valpromide et du MS-275 sur l'érythropoïèse, au niveau cellulaire 122
4.3.4 Effet du valpromide et du MS-275 sur l'érythropoïèse, au niveau moléculaire 128
4.4 EFFET DE L'ACIDE VALPROÏQUE SUR LA MEGACARYOPOÏESE 134
4.4.1 Analyse de l'acide valproïque au niveau cellulaire, sur la différenciation mégacaryocytaire des cellules Meg-01 134
4.4.2 Analyse de l'effet de l'acide valproïque au niveau moléculaire, sur la différenciation mégacaryocytaire des cellules Meg-01 139

5 DISCUSSION 144

5.1 CHOIX DES MODELES CELLULAIRES 144

5.2 L'ACIDE VALPROÏQUE ET LA DIFFERENCIATION 146
5.3 L'ACIDE VALPROÏQUE ET SON ACTIVITE INHIBITRICE D'HISTONE DESACETYLASE 152

6 CONCLUSION ET PERSPECTIVES 155

7 BIBLIOGRAPHIE 159

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : L'hématopoïèse 4
Figure 2 : Les différents modèles de différenciation des cellules souches hématopoïétiques 5
Figure 3 : L'hématopoïèse et les différentes cytokines impliquées dans ce processus 7
Figure 4 : Les facteurs de transcription au cours de l'hématopoïèse 8
Figure 5 : L'érythropoïèse 13
Figure 6 : Les îlots érythroblastiques 14
Figure 7 : Les principaux marqueurs de différenciation érythrocytaire 16
Figure 8 : La mégacaryopoïèse 21
Figure 9 : Les principaux marqueurs de différenciation mégacaryocytaire 22
Figure 10 : Les principaux facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse et de la mégacaryopoïèse. 25
Figure 11 : La balance GATA-1/GATA-2 impliquée dans la régulation de l'érythropoïèse 29
Figure 12 : Localisation génomique des miR 35
Figure 13 : La biogénèse des miR 36
Figure 14 : Les différents modes d'action des miR au niveau de la traduction 39
Figure 15 : Les principaux miR et facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse et de la mégacaryopoïèse. 43
Figure 16 : Les différents niveaux d'organisation de la chromatine 46
Figure 17 : Principales modifications post-traductionnelles des histones 47
Figure 18 : Rôle des HAT et des HDAC sur l'activation de la transcription 49
Figure 19 : A. Formule développée de l'acide valproïque, B. Formule développée de l'acide valérique, C. Valériane officinale 56
Figure 20 : Conditions de culture et de différenciation des cellules $CD34^+$ 67
Figure 21 : Schéma récapitulatif du protocole d'extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires, (Adapté de (Schreiber et al. 1989)) 73
Figure 22 : Schéma explicatif de la technique d'immunoprécipitation 78
Figure 23 : Effet du VPA sur la différenciation érythroïde des cellules TF1 87
Figure 24 : Effet du VPA sur la viabilité et la prolifération des cellules TF1 88
Figure 25 : Effet du VPA sur la différenciation des cellules $CD34^+$ 90

Figure 26 : Effet du VPA sur la viabilité des cellules CD34+ 91
Figure 27 : Effet du VPA sur l'expression des miR impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse dans les cellules TF1 et K562 95
Figure 28 : Effet du VPA sur la viabilité et la prolifération cellulaire des cellules K562. 96
Figure 29 : Effet de l'Epo et du GM-CSF sur l'expression des miR-144 et 451 et sur l'expression de GATA-1 99
Figure 30 : Analyse de l'expression du facteur de transcription GATA-1 dans les cellules TF1 et K562 traitées au VPA pendant 6, 24 et 48h 100
Figure 31 : Effet du VPA sur l'expression des miR-144/451 matures, du pré-miR-144/451 et de GATA-1 dans les cellules K562 induites à se différencier avec de l'aclacinomycine 102
Figure 32 : Effet du VPA sur l'expression de protéines impliquées dans la biogénèse des miR 103
Figure 33 : Analyse de l'effet de l'aclacinomycine et du VPA sur la viabilité des cellules K562 105
Figure 34 : Effet du VPA sur l'expression des miR et des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse dans les cellules CD34+ 108
Figure 35 : L'action du VPA sur l'interaction entre GATA-1 et PU.1 et sur l'acétylation de GATA-1 109
Figure 36 : Effet de l'inhibiteur du miR-451 sur la viabilité des cellules et sur l'expression apparente du miR-451 dans des cellules K562 transfectées 113
Figure 37 : Comparaison entre l'effet du VPA et l'effet de l'inhibiteur de miR-451 sur la production d'hémoglobine dans les cellules K562 induites par de l'aclacinomycine 114
Figure 38 : Effet de l'inhibiteur du miR-451 sur l'expression de protéines décrites comme cibles du miR-451 116
Figure 39 : Effet du Valpromide et du MS-275 sur la viabilité des cellules TF1 118
Figure 40 : Effet du VPM et du MS-275 sur la prolifération cellulaire des cellules TF1119
Figure 41 : Analyse du statut d'acétylation de l'histone H4 en réponse au VPA, MS-275, VPM et SAHA 121
Figure 42 : Etude de l'effet du VPM et du MS-275 sur la différenciation érythroïde en comparaison avec l'effet du VPA 124

Figure 43 : Effet du VPM sur la différenciation érythroïde des cellules K562 induites avec de l'aclacinomycine et des CD34+ induites avec de l'Epo 125
Figure 44 : Effet du VPM sur la différenciation érythroïde et sur la viabilité des cellules CD34+ 126
Figure 45 : Expression du facteur de transcription GATA-1 et de la γ-globine dans les cellules TF1 traitées avec du VPA, du VPM ou du MS-275 129
Figure 46 : Analyse de l'expression des miR-144 et 451 dans les cellules TF1 traitées avec du VPM et du MS-275 130
Figure 47 : Effet du VPM sur l'expression du facteur de transcription GATA-1 dans les cellules K562 induites avec de l'aclacinomycine 131
Figure 48 : Effet du VPM sur l'expression des miR-144 et 451 dans les cellules K562 induites avec de l'aclacinomycine 132
Figure 49 : Effet du VPA sur la morphologie des cellules Meg-01 135
Figure 50 : Analyse par cytométrie de flux du marqueur mégacaryocytaire CD61 dans les cellules Meg-01 136
Figure 51 : Effet du VPA sur la viabilité et la prolifération cellulaire des cellules Meg-01 138
Figure 52 : Effet du VPA sur l'expression des miR impliqués dans la régulation de la mégacaryopoïèse 140
Figure 53 : Effet du VPA sur l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la mégacaryopoïèse 141
Figure 54 : Expression des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la mégacaryopoïèse dans les cellules CD34+ 143
Figure 55 : Le VPA module le micro-réseau de régulation impliqué dans le développement érythro-mégacaryocytaire 156

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les différentes histones désacétylases (HDAC) exprimées chez l'Humain ... 51
Tableau 2 : Anticorps utilisés pour la cytométrie de flux ... 70
Tableau 3 : Composition des tampons A et C utilisés pour l'extraction des facteurs cytoplasmiques et nucléaires. ... 72
Tableau 4 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les western blots ... 75
Tableau 5 : Séquences des amorces pour PCR et des miR ... 82
Tableau 6 : Equations utilisées pour le calcul des valeurs ΔCt et ΔΔCt ... 82

ABREVIATIONS

Ac-H4: Histone H4 acétylée

Acétyl-CoA: Acétyl Coenzyme A

Acla: Aclacynomycine

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ADNc: Acide Désoxyribonucléique Complémentaire

Ago2: Argonaute 2

APC: Polypose adénomateuse coli

ARN: Acide Ribonucléique

ARNase: Ribonucléase

ARNm: Acide Ribonucléique messager

ATP: Adénosine tri-phosphate

Baso: Erythroblaste basophile

Bcl-2: B-cell leukemia/lymphoma 2

Bcl-x_L: B cell lymphoma-extra large

Bcr/Abl: Breakpoint cluster region/Abelson

BFU-E: Burst Forming Units - Erythroïde

ASB: Albumine de sérum bovin

ASB-T: Albumine de sérum bovin – Tween

C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein

CB: Bleu de Coomassie

CBFβ: Core Binding Factor β

CBP: CREB-binding protein

CD: Cluster de différenciation

CFU-Baso: Colony Forming Units-Basophile

CFU-E: Colony Forming Units-Erythrocyte

CFU-Eo: Colony Forming Units-Eosinophile

CFU-GEMM: Colony Forming Units-Granulocyte/Erythrocyte/Macrophage/Megakaryocyte

CFU-GM: Colony Forming Units-Granulocyte/Monocyte

CFU-MK: Colony Forming Units-Mégacaryocyte

CI-994 : N-acétyldinaline

CLP: Progéniteurs lymphoïdes communs

CPL: Cellule progénitrice lymphoïde

CPM: Cellule progénitrice myéloïde

CSH: Cellules souches hématopoïétiques

Ct: Cycle threshold

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DNMT: ADN Méthyl Transférase

Dox: Doxorubicine

DTT: Dithiothréitol

E.Baso.: Erythroblaste basophile

E.Ortho.: Erythroblaste orthochromatophile

E.Poly. : Erythroblaste polychromatophile

EDTA: Acide éthylenediaminetétracetique

EGTA: Acide éthylèneglycoltétracétique

eIF4E: *Eukaryotic initiation factor 4E*

EKLF: Erythroid Kruppel-like Factor

Epo: Erythropoïétine

EpoR : Récepteur à l'Epo

Eryth.: Erythrocyte

ETS: E26 transformation-specific

FDA: Food and Drug Admninistration

FOG: Friend of GATA

Fli-1: Friend leukemia integration 1

FK228: Depsipeptide

FT: Facteur de transcription

GABA: Acide Gamma Amino Butyrique

GABA-T: GABA transaminase

GABP-α: GA-binding protein alpha chain

GATA-1s: GATA-1 short

GMP: Progéniteurs granulocytaires et macrophagiques

GM-CSF: Granulomonocyte-colony stimulating factor

GPA: Glycophorine A

H4: Histone H4

HAT: Histones Acétyl Transférases

Hb: Hémoglobine

HDAC: Histones Désacétylases

HDACi: Inhibiteur d'HDAC

HEPES: Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HIF: Hypoxia-inducible factor

HLA : Human Leucocyte Antigen

HP1 : Heterochromatin protein 1

HRP: Horseradish Peroxydase

HSP: Heat shock protein

IFN: Interféron

IgG: Immunoglobuline G

IL: Interleukine

IMF: Intensité moyenne de fluorescence

JAK : Janus Kinase

KO: Knock Out

Ldb1: LIM domain-binding protein 1

LMA: Leucémie myéloïde aigüe

LMC: Leucémie myéloïde chronique

LMPP: Progéniteur lymphoïde multipotent intermédiaire

Lmo2: Lim only protein 2

M-CSF: Monocyte-colony stimulating factor

MACS: Magnetic cell sorting

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

Mcl-1 : Myeloid cell leukemia 1

MEP: Progéniteurs mégacaryocytaires et érythrocytaires

MGG: May-Grünwald Giemsa

miR : Micro-ARN

MK: Mégacaryocytaire

MPP: Progéniteurs multipotents

MPER: Mammalian Protein Extraction Reagent

MyB: Progéniteurs myéloïdes avec des cellules B potentielles

MyBT: Progéniteurs myéloïdes avec des cellules B et T potentielles

MyE: Progéniteurs myéloïdes avec des cellules érythroïdes potentielles

MyT: Progéniteurs myéloïdes avec des cellules T potentielles

NAD: Nicotinamide adénine dinucléotide

ND: Non déterminé

NF-κB : Nuclear factor κB

NF-E2: Nuclear Factor Erythroid 2

NFI-A: Nuclear Factor I/A

NK: Natural Killer

NT: Non Traduite

NTP: Nucléoside triphosphate

NuRD: Nucleosome Remodeling Deacetylase

Ortho: Erythroblaste orthochromatophile

PABP: Poly(A)-binding protein

PBMC: *Peripheric Blood Mononuclear Cell* (Cellules mononucléées du sang périphérique)

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PE: Phycoérythrine

PGM: Progéniteur Granulocyte-Monocyte

PI3K: Phosphoinositide-3-kinase

PME: Progéniteur Mégacaryo-Erythroïde

PMSF: Phénylméthylsulfonyle

Pol: ARN polymérase

Poly: Erythroblaste polychromatophile

PPO: Peroxydase plaquettaire

Pré-ARNm: Pré-ARN messager

Pré-miR: Précurseur de miR

Pre-B: Pré-lymphoblaste B

Pre-T: Pré-lymphoblaste T

Pri-miR: MiR primaire

Pro-B: Pro-lymphoblaste B

Pro-E: Proérythroblaste

Pro-T: Pro-lymphoblaste T

PVDF: Polyvinylidene fluoride

QSP: Quantité suffisante pour

Ret.: Réticulocyte

RhEpo: Erythropoïétine recombinante humaine

RISC: RNA-Induced Silencing Complex

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RUNX1: Runt-related transcription factor 1

RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

SAHA: Suberoylanilide acide hydroxamique

SCF: Stem Cell Factor

SDS: Dodécylsulfate de sodium

SH2: Src Homology 2

SHP-1: Src homology phosphatase-1

SMC: Structural Maintenance of Chromosomes

SOCS: Suppressors of cytokine signalling

STAT: Signal transducer and activator of transcription

SVF: Sérum de veau fœtal

T. amb.: Température ambiante

TAL1: T-cell acute lymphoblastique leukemia 1

TCF3: E2A immunoglobulin enhancer-binding factors E12/E47

TNF-α: Tumor necrosis factor alpha

TPA: 12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate, ester de phorbol,

TPO: Thrombopoïétine

TRBP: HIV-1 TAR RNA binding protein

TSA: Trichostatine A

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VIH: Virus d'immunodéficience humaine

VPA: Acide valproïque

VPM: Valpromide

XBP1: X-box binding protein 1

1 Introduction

1.1 L'hématopoïèse

L'hématopoïèse comprend l'ensemble des phénomènes qui assurent la production et le remplacement continu et régulé des cellules sanguines. Au cours de la vie fœtale, 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 de la tête fémorale. Ce sont donc des points de ponctions en cas de soupçon de problèmes hématopoïétiques. 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 courte puisqu'elle est de quelques heures pour les polynucléaires, de quelques jours pour les plaquettes et de plusieurs semaines pour les hématies. Les cellules du sang 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 très important de cellules sanguines (environ 6.10^{11} cellules/jour). Cette production importante est assurée par une petite population de cellules de la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les CSH sont des cellules indifférenciées et multipotentes avec une capacité accrue d'autorenouvellement, de prolifération et de différenciation.
Pendant l'hématopoïèse, un équilibre s'établit entre la production de nouvelles cellules souches par division cellulaire (autorenouvellement), et la production de cellules qui vont s'engager dans une voie de différenciation. Ceci est possible grâce à la capacité des cellules souches à se diviser de manière asymétrique (Knoblich 2008), donnant naissance à de nouvelles cellules souches et à des cellules progénitrices prêtes à se différencier. Chez l'adulte, cette division asymétrique permet donc le maintien du nombre de cellules souches et le maintien de l'homéostasie hématopoïétique (Inaba et al. 2012). De manière alternative, les CSH peuvent générer deux cellules filles dont une seule restera en contact avec la niche de cellules souches et conservera ses capacités d'autorenouvellement, tandis que l'autre cellule s'engagera spécifiquement vers une des voies de différenciation. Ces niches forment

un microenvironnement local qui est indispensable au maintien des cellules souches (Becerra et al. 2011). Les niches sont constituées de cellules souches et de cellules de soutien, le tout régulé par des facteurs sécrétés et des interactions directes avec la matrice extracellulaire qui entoure la niche. Les cellules souches hématopoïétiques font partie des niches transitoires. Contrairement aux niches permanentes, ces niches transitoires ne sont présentes dans l'organisme qu'en réponse à un stress ou à un certain stade de développement. Les CSH restent dans un état de dormance pendant une grande partie de leur vie, mais, lorsque l'organisme a besoin de générer des cellules différenciées, les CSH entrent dans le cycle cellulaire (Baldridge et al. 2010). Deux types de niches de CSH ont été décrits : la niche endostéale où les CSH sont proches des ostéoblastes de l'os trabéculaire et la niche péri-vasculaire où les cellules sont proches de l'endothélium vasculaire dans les sinus de la moelle (Renstrom et al. 2010).

Les CSH peuvent s'engager vers l'une ou l'autre des deux lignées hématopoïétiques myéloïde ou lymphoïde. Au moins trois modèles ont été proposés pour expliquer le développement hiérarchique de l'hématopoïèse (Ema et al. 2014). Selon le modèle classique (Akashi et al. 2000), les CSH multipotentes donnent naissance à un progéniteur hématopoïétique, puis à un précurseur de la lignée lymphoïde ou myéloïde. Les progéniteurs sont des cellules présentant une capacité d'autorenouvellement et de multipotence plus restreinte que celle des CSH. La cellule progénitrice lymphoïde (CPL) va se différencier d'abord en précurseurs immatures, les lymphoblastes, pour aboutir aux lymphocytes T et B. La cellule progénitrice myéloïde génère des CFU-GEMM (colony forming units-Granulocyte/Erythrocyte/Macrophage/Megacaryocyte), qui vont évoluer vers des progéniteurs plus différenciés comme les CFU-GM (Granulocyte/Monocyte), -Eo (Eosinophile), -B (Basophile), -MK (Mégacaryocyte) ou -E (Erythrocyte). Ces progéniteurs sont spécifiques d'une seule lignée et aboutissent eux-mêmes à des précurseurs immatures (myéloblastes, monoblastes, proérythroblastes et mégacaryoblastes), qui donneront naissance aux granulocytes, aux monocytes/macrophages, aux érythrocytes et aux plaquettes (Figure 1). Ce modèle est schématisé Figure 2A.

Le deuxième modèle (Kawamoto et al. 1997), propose une plus grande plasticité des CSH car elles peuvent générer les progéniteurs myéloïdes avec des cellules

érythroïdes potentielles (MyE) ou aux progéniteurs myéloïdes avec des cellules B et T potentielles (MyBT). Les progéniteurs MyBT peuvent donner naissance aux progéniteurs myéloïdes avec des cellules B potentielles (MyB) ou progéniteurs myéloïdes avec des cellules T potentielles (MyT). Ce modèle est schématisé Figure 2B.

Dans le troisième modèle (Mansson et al. 2007), les auteurs suggèrent que les progéniteurs multipotents (MPP) donnent naissance directement aux progéniteurs mégacaryocytaires et érythrocytaires (MEP), alors qu'un progéniteur lymphoïde multipotent intermédiaire (LMPP) génère les progéniteurs granulocytaires et macrophagiques (GMP) et les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP). Ce modèle est schématisé Figure 2C.

Quelle que soit la lignée hématopoïétique considérée, le processus de différenciation s'établit selon une certaine chronologie entraînant de nombreuses étapes de maturation. Les différents niveaux représentés par les CSH multipotentes, les progéniteurs communs multipotents, les précurseurs engagés et les cellules différenciées, sont caractérisés par des modifications progressives aux niveaux morphologique, biochimique et fonctionnel.

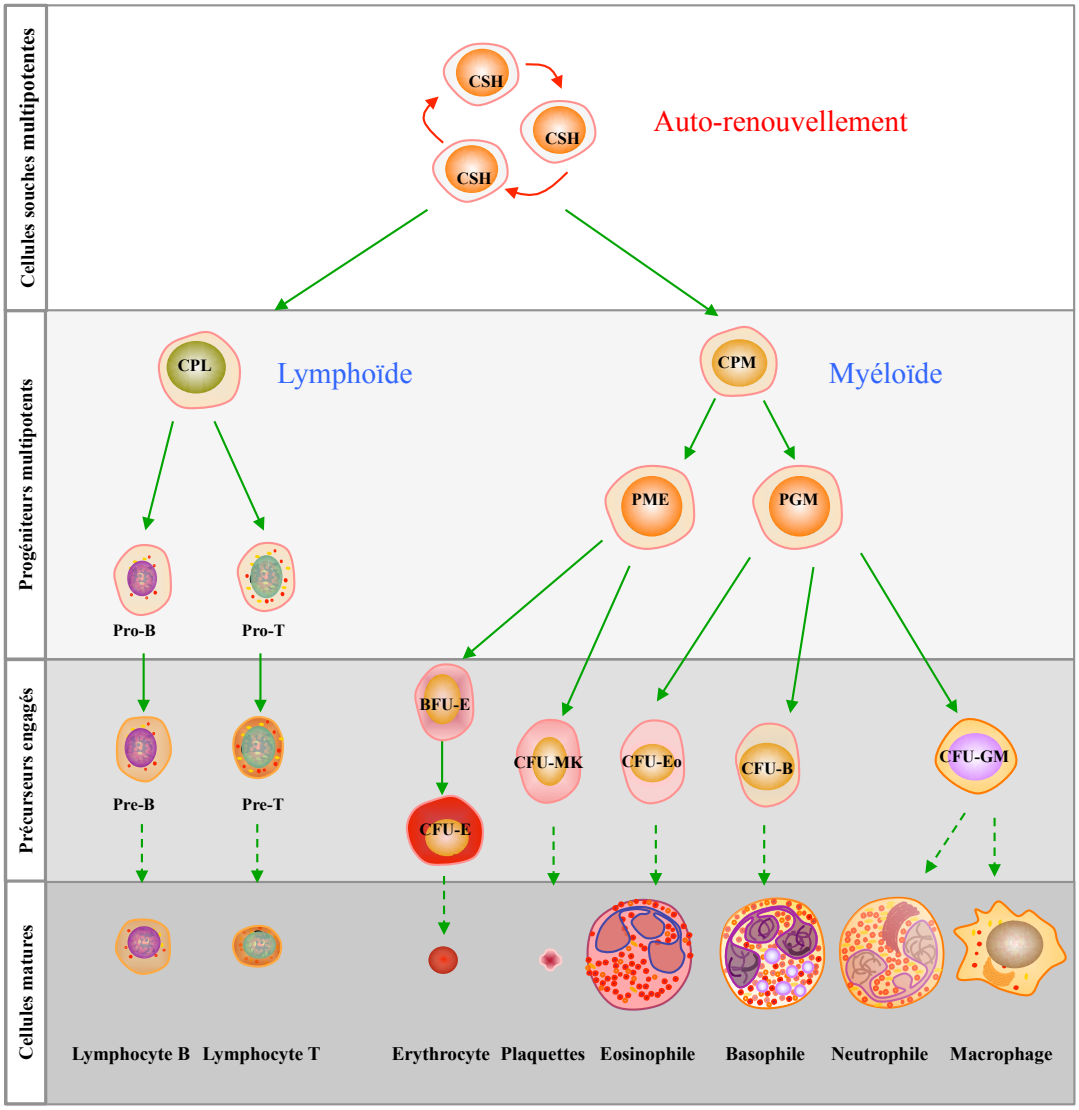


Figure 1 : L'hématopoïèse

La cellule souche hématopoïétique (CSH) est engagée vers la lignée myéloïde ou lymphoïde. Elle génère des cellules progénitrices myéloïdes (CPM) ou lymphoïdes (CPL). Ces progéniteurs vont se différencier de façon spécifique et donner l'ensemble des cellules sanguines. ProT ou B: pro-lymphoblaste T ou B; preT ou B: pré-lymphoblaste T ou B; PME : Progéniteur Mégacaryo-Erythroïde; CFU-: Colony Forming Units-; BFU-: Burst Forming Units-; PGM : Progéniteur Granulocyte-Monocyte ; GM: Granulocyte-Monocyte; B: Basophile; Eo: Eosinophile; MK: Mégacaryocyte; E : Erythroïde; IL: interleukine; SCF: stem cell factor; GM-CSF: granulomonocyte-stem cell factor; M-CSF: monocyte-stem cell factor; TPO: thrombopoïétine; EPO: érythropoïétine (Adapté de (Orkin et al. 2008)).

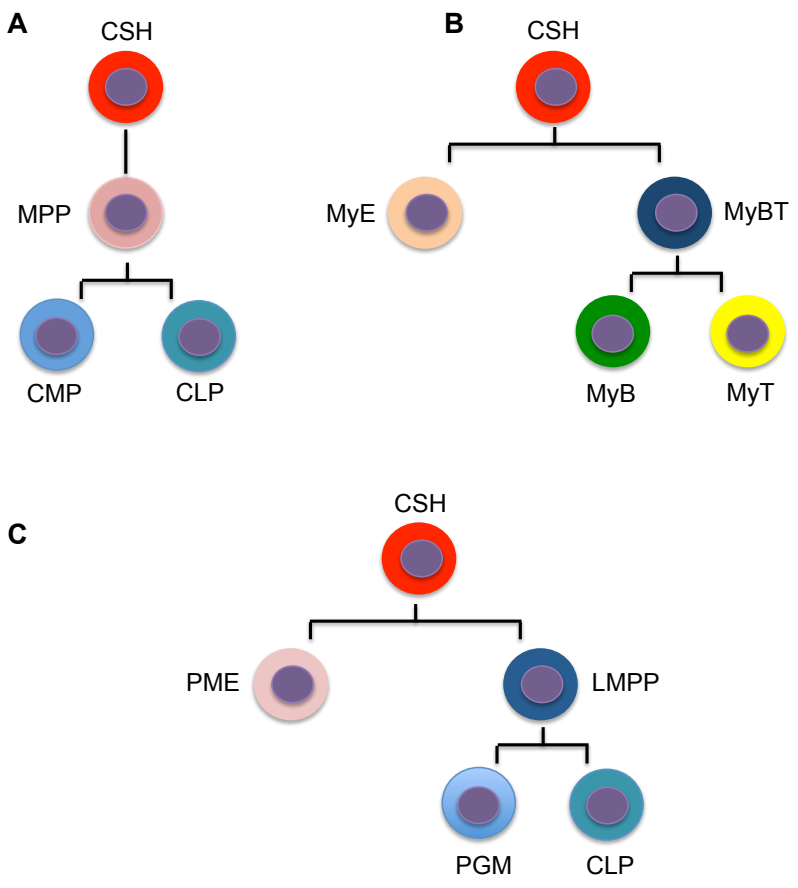


Figure 2 : Les différents modèles de différenciation des cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) peuvent se différencier de façon hiérarchique, selon 3 modèles différents. A : Le modèle classique montre que les CSH donnent naissance aux progéniteurs multipotents (MPP) qui génèrent les progéniteurs myéloïdes communs (CMP) ou les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP). B : Les CSH donnent naissance aux progéniteurs myéloïdes avec des cellules érythroïdes potentielles (MyE) ou aux progéniteurs myéloïdes avec des cellules B et T potentielles (MyBT). Les progéniteurs MyBT donnent ensuite naissance aux progéniteurs myéloïdes avec des cellules B potentielles (MyB) et aux progéniteurs myéloïdes avec des cellules T potentielles (MyT). C : Les CSH donnent naissance aux progéniteurs mégacaryo-érythroïdes (PME) ou aux progéniteurs lymphoïdes multipotents intermédiaires (LMPP). Ces progéniteurs intermédiaires (LMPP) vont ensuite donner naissance aux progéniteurs Granulocytes-Macrophages (PGM) ou aux progéniteurs lymphoïdes communs (Adapté de (Ema et al. 2014)).

La régulation de l'autorenouvellement, de la prolifération et de la différenciation de toutes ces cellules implique l'action de cytokines, de chémokines, de facteurs de croissance (Figure 3) et de facteurs de transcription (Figure 4) (Broxmeyer et al. 1989; Broxmeyer et al. 2005; Wickrema et al. 2007) ainsi que des interactions cellule-cellule impliquant les cellules stromales de la moelle osseuse.

Les différentes cellules hématopoïétiques prolifèrent, se différencient et achèvent leur maturation dans la moelle osseuse pour gagner ensuite la circulation sanguine et remplir leur fonction au niveau des tissus. Les lymphocytes T font exception puisqu'ils terminent leur maturation dans le thymus, les nœuds lymphatiques et la rate.

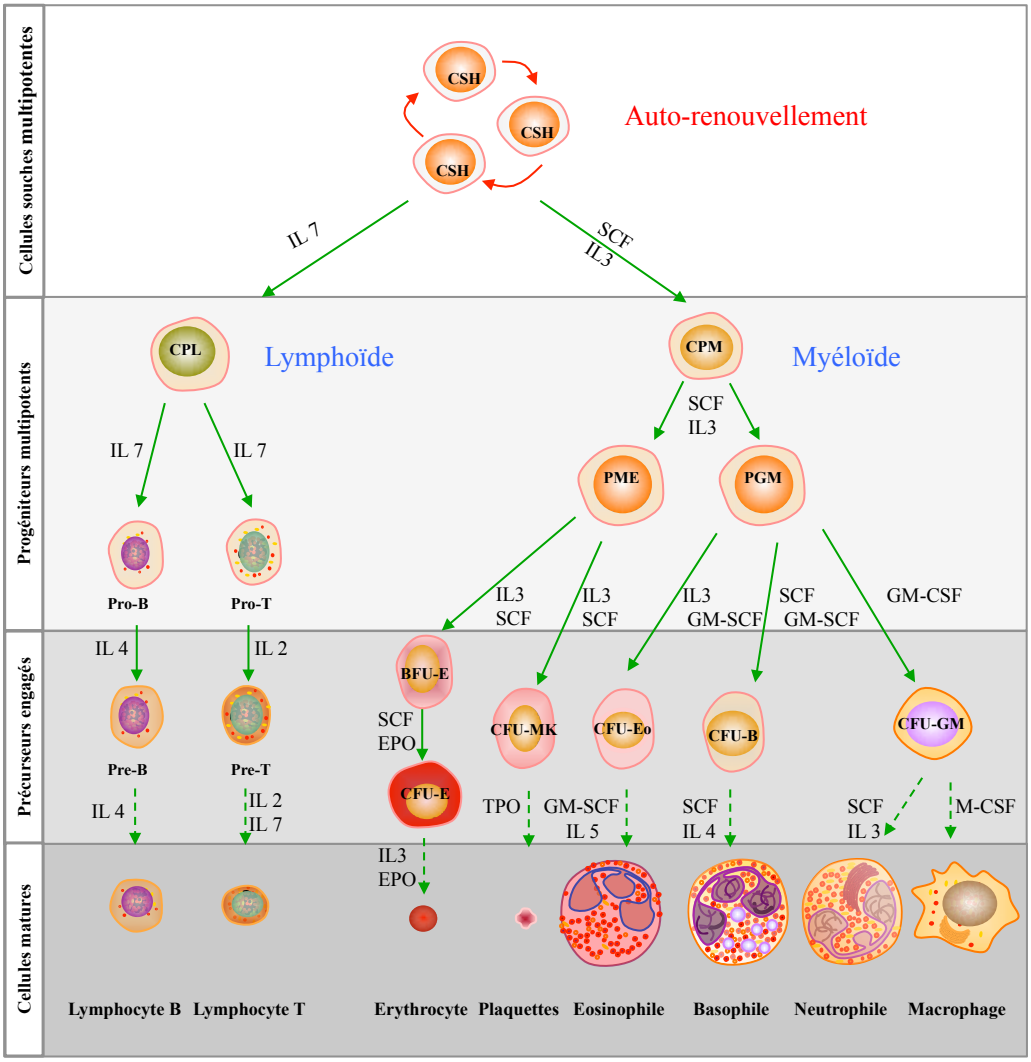


Figure 3 : L'hématopoïèse et les différentes cytokines impliquées dans ce processus

La cellule souche hématopoïétique (CSH) est engagée vers la lignée myéloïde ou lymphoïde sous l'effet de cytokines spécifiques. 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 sanguines. ProT ou B: pro-lymphoblaste T ou B; preT ou B: pré-lymphoblaste T ou B; PME : Progéniteur Mégacaryo-Erythroïde; CFU-: Colony Forming Units-; BFU-: Burst Forming Units-; PGM : Progéniteur Granulocyte-Monocyte ; GM: Granulocyte-Monocyte; B: Basophile; Eo: Eosinophile; MK: Mégacaryocyte; E : Erythroïde; IL: interleukine; SCF: stem cell factor; GM-CSF: granulomonocyte-stem cell factor; M-CSF: monocyte-stem cell factor; TPO: thrombopoïétine; EPO: érythropoïétine (Adapté de (Orkin et al. 2008)).

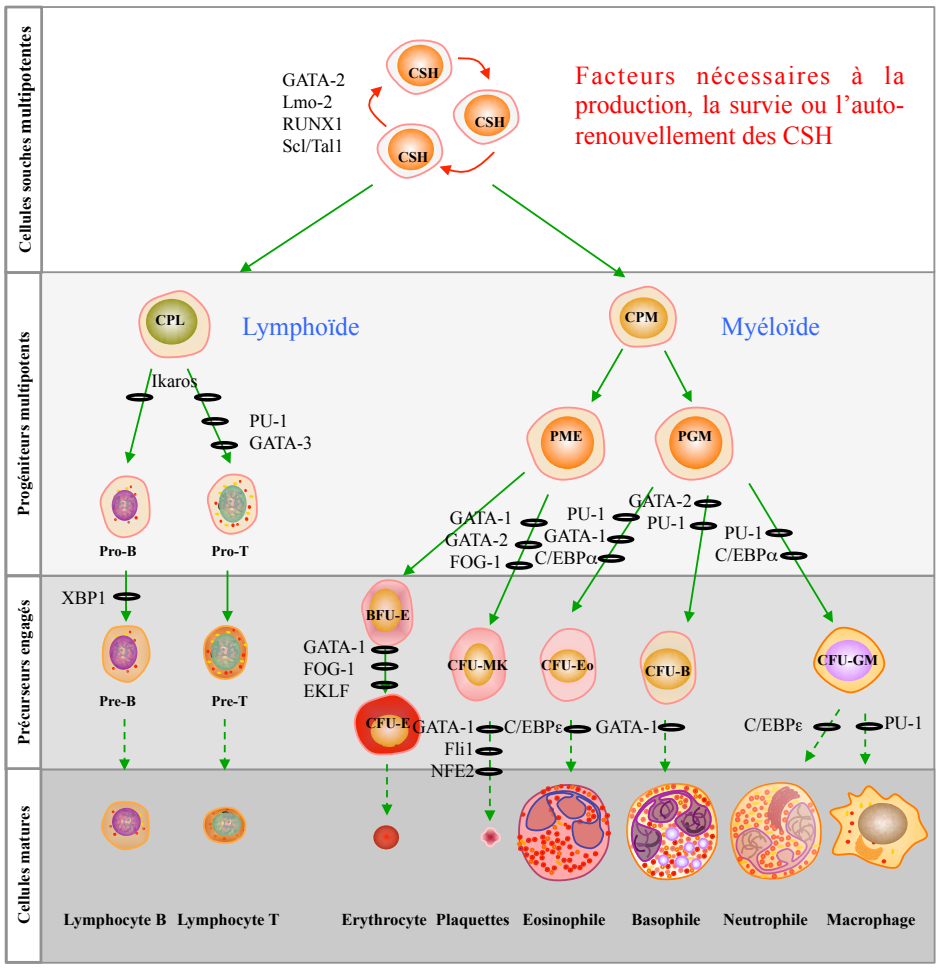


Figure 4 : Les facteurs de transcription au cours de l'hématopoïèse

La différenciation des cellules hématopoïétiques à partir de la cellule souche (CSH) vers la lignée myéloïde ou lymphoïde est dépendante de l'expression et de la combinaison des facteurs de transcription. CPM : cellules progénitrices myéloïdes ; CPL : cellules progénitrices lymphoïdes ; ProT ou B: pro-lymphoblaste T ou B; preT ou B: pré-lymphoblaste T ou B; PME : Progéniteur Mégacaryo-Erythroïde; CFU-: Colony Forming Units-; BFU-: Burst Forming Units-; PGM : Progéniteur Granulocyte-Monocyte ; GM: Granulocyte-Monocyte; B: Basophile; Eo: Eosinophile; MK: Mégacaryocyte; E : Erythroïde; Lmo-2 : LIM only protein 2 ; Scl/Tal-1 : Stem cell leukemia/T-cell acute lymphoblastic leukemia 1 ; RUNX1 : Runt-related transcription factor FOG-1 : Friend of GATA-1 ; EKLF : Erythroid Kruppel-like factor ; NF-E2 : Nuclear factor erythroid ; C/EBP : CCAAT-enhancer binding protein ; Fli-1 : Friend leukemia integration 1 : XBP1 : X-box binding protein 1 (Adapté de (Orkin et al. 2008)).

Les cellules hématopoïétiques sont caractérisées par des marqueurs de surface (antigènes) permettant de définir l'appartenance d'une cellule à une lignée hématopoïétique (lignée érythrocytaire, lymphocytaire, granulocytaire,…) et son stade de différenciation. En effet, en fonction de leur stade de différenciation, les cellules vont exprimer des antigènes de surface différents, appelés CD (cluster de différenciation). Par exemple, les CSH expriment des marqueurs de surface qui leur sont caractéristiques tels que le CD34 et le CD90 (également appelé Thy-1) qui sont des glycoprotéines transmembranaires fortement glycosylées. Le marqueur CD135 également appelé FLT3 ou FLK2, est un récepteur tyrosine kinase qui sert généralement à différencier les CSH qui n'expriment pas ce marqueur (CD135-), des progéniteurs multipotents qui l'expriment (CD135+).

Les CSH peuvent également être identifiées et isolées par immunomarquage et tri magnétique sur colonne (Broxmeyer et al. 1989; Broxmeyer et al. 1993; Broxmeyer et al. 2005).

Les sources de cellules souches hématopoïétiques et de progéniteurs $CD34^+$ sont diverses, mais c'est dans la moelle osseuse qu'elles sont les plus abondantes. Elles sont également présentes, en quantité plus faible, dans le sang de cordon ombilical qui constitue une source intéressante, compte tenu de la relative simplicité du prélèvement qui est dépourvu de risque et ne provoque pas de douleur. Le sang périphérique renferme également des cellules $CD34^+$, mais bien que la source soit facilement disponible, la quantité de cellules reste très faible. Le sang de cordon ombilical représente une bonne alternative en tant que source de cellules souches hématopoïétiques et de progéniteurs $CD34^+$.

1.2 L'Erythropoïèse et la mégacaryopoïèse dérivent d'un progéniteur commun

1.2.1 L'Erythropoïèse

L'érythropoïèse est un processus physiologique complexe qui permet la formation des érythrocytes également appelés hématies ou globules rouges matures. Les érythrocytes de forme biconcave, anucléés et composés essentiellement d'hémoglobine, jouent un rôle essentiel dans le transport de l'oxygène moléculaire

vers les tissus, permettant ainsi le maintien de leur oxygénation. Ils assurent également le transport du CO_2 des tissus vers les poumons afin de l'évacuer.
A partir d'une CSH, deux cent milliards d'érythrocytes sont produits par jour, représentant ainsi le plus grand rendement du système hématopoïétique. La durée d'une érythropoïèse normale, à partir du pro- érythroblaste est de 5 jours. La durée de vie des globules rouges est en moyenne de 120 jours ce qui implique une régulation fine et précise de leur production afin de maintenir l'homéostasie du système.

Description de l'érythropoïèse au niveau moléculaire :

Au début de la vie embryonnaire, les premières hématies apparaissent au 21ème jour de l'embryogénèse, dans les îlots sanguins du sac vitellin. A partir du 2ème mois, l'érythropoïèse se localise dans le foie et la rate qui deviennent les principaux lieux de production érythrocytaire. A partir du 5ème mois, elle se localise exclusivement au niveau de la moelle osseuse (Orkin et al. 2008).
L'érythropoïèse peut être divisée en deux étapes : l'érythropoïèse précoce et l'érythropoïèse tardive.
Les CFU-GEMM (Colony Forming Unit Granulocyte-Erythrocyte-Megakaryocyte-Macrophage), qui proviennent directement des CSH, sont caractérisées par l'expression des marqueurs de surface cellulaire comme le CD33, CD34 et Human Leucocyte Antigen (HLA)-DR. Sous l'influence de cytokines comme l'interleukine-3 (IL3) et de facteurs de croissance comme le Stem cell factor (SCF) ou les CFU-GEMM vont se différencier en progéniteurs érythroïdes immatures appelés BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid), qui constituent les progéniteurs engagés les plus précoces et identifiables *ex vivo* (Gregory et al. 1978). Ces grandes colonies contenant jusqu'à plusieurs milliers de cellules très riches en hémoglobine, apparaissent dans les cultures de méthylcellulose après 10 à 14 jours. Les BFU-E expriment également le CD33, CD34 et HLA-DR mais la maturation de ces cellules s'accompagne d'une augmentation progressive des récepteurs à l'érythropoïétine (EpoR), rendant les cellules de plus en plus dépendantes à l'Epo (Dessypris et al. 1988). Les BFU-E sont sensibles à un grand nombre de cytokines qui conditionnent la croissance, la différenciation et la survie de ces cellules. Par exemple, l'IL3 stimule la croissance des BFU-E. *In vitro* et *in vivo,* cette cytokine semble être indispensable pour rendre les cellules progénitrices sensibles à l'action d'autres cytokines. L'IL3 va induire des

signaux à travers différentes voies de signalisation et influence donc la différenciation des cellules et la production des cellules matures.

D'autres facteurs comme le SCF, la thrombopoïétine (TPO) et l'IL11 jouent également un rôle important (Dzierzak et al. 2013). La liaison du SCF à son récepteur c-kit induit des signaux intracellulaires de survie et de prolifération des progéniteurs érythroïdes. Lorsque la TPO est utilisée *in vitro* avec l'IL3 et l'IL11, cette combinaison de cytokines entraîne une augmentation de la prolifération des BFU-E. De plus, l'IL11 est aussi capable de stimuler la prolifération des BFU-E en présence d'IL3 et en absence d'Epo.

Les plus matures des progéniteurs érythroïdes sont les CFU-E (colony- forming units-erythroid). Ces cellules résultent de la maturation des BFU-E et n'expriment plus les marqueurs d'immaturité tels que le CD34 et le HLA-DR alors qu'elles expriment à leur surface l'EpoR, le CD36, le récepteur à la transferrine CD71, puis la glycophorine A (GPA). L'expression de la GPA est augmentée lors de la maturation érythroïde terminale. De toutes les cellules progénitrices érythroïdes, les CFU-E sont celles qui présentent le plus haut niveau d'expression de récepteurs à l'Epo, rendant ces cellules dépendantes de cette cytokine. L'Epo devient alors indispensable à leur survie et leur différenciation. Après 3 à 5 divisions cellulaires en 3 jours, sous l'effet de l'Epo, les CFU-E perdent leur capacité de se diviser, aboutissant au stade terminal de différenciation avec l'expulsion du noyau des cellules (énucléation).

La caractérisation morphologique de la différenciation érythroïde :

Dans la moelle osseuse, les CFU-E génèrent précurseurs érythroblastiques : les proérythroblastes qui génèrent les érythroblastes basophiles, polychromatophiles et orthochromatophiles, qui eux donnent les réticulocytes puis les érythrocytes matures (Figure 5). Lors de la progression de la différenciation et de la maturation érythroïde, des modifications morphologiques des érythroblastes sont observées. Ces modifications se traduisent par une diminution de la taille des cellules, la condensation de la chromatine, l'hémoglobinisation et l'énucléation. Dans la moelle osseuse, la différenciation terminale des érythroblastes s'effectue en étroite interaction avec des macrophages pour former des « îlots érythroblastiques » (Figure 6). Des études antérieures ont montré que les macrophages sont capables d'induire l'érythropoïèse en transférant directement le fer aux progéniteurs érythroïdes (Bessis

et al. 1962). Récemment, il a été démontré dans une culture d'îlots érythroblastiques que la ferritine produite par les macrophages serait libérée par exocytose et engloutie par les érythroblastes par endocytose. Une fois à l'intérieur des érythroblastes, le fer serait libéré de la ferritine par acidification et protéolyse et serait ainsi disponible pour la production d'hème au niveau des précurseurs érythroïdes (de Back et al. 2014). Au cours de la dernière étape de la différenciation érythroïde, l'érythroblaste expulse son noyau formant ainsi un réticulocyte. Lors de ce processus, le macrophage joue un rôle essentiel car il va phagocyter et dégrader le noyau expulsé, et donc promouvoir l'érythropoïèse. L'expulsion du noyau est un phénomène mécanique qui entraîne une perte progressive d'affinité du réticulocyte pour le macrophage, ce qui conduit au passage du réticulocyte dans la circulation sanguine. L'interaction entre les macrophages et les globules rouges peut avoir lieu dans la rate et le foie, notamment lors de la dégradation des réticulocytes âgés et en fin de vie (Mebius et al. 2005).

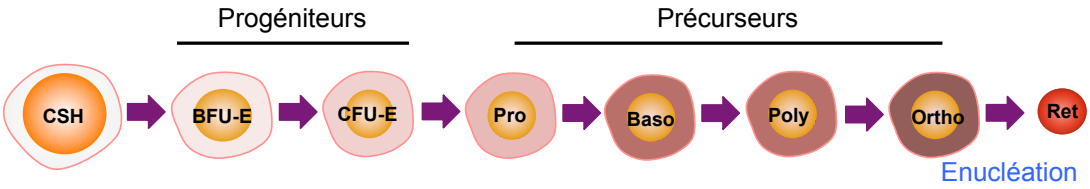


Figure 5 : L'érythropoïèse

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). CSH : Cellule souche hématopoïétique ; BFU-E : Burst forming unit erythroid ; CFU-E : colony forming unit erythroid ; Pro: Proérythroblaste; Baso : Erythroblaste basophile ; Poly : Erythroblaste polychromatophile ; Ortho : Erythroblaste orthochromatophile ; Ret : Réticulocyte ≠ Erythrocyte = Globules rouges.

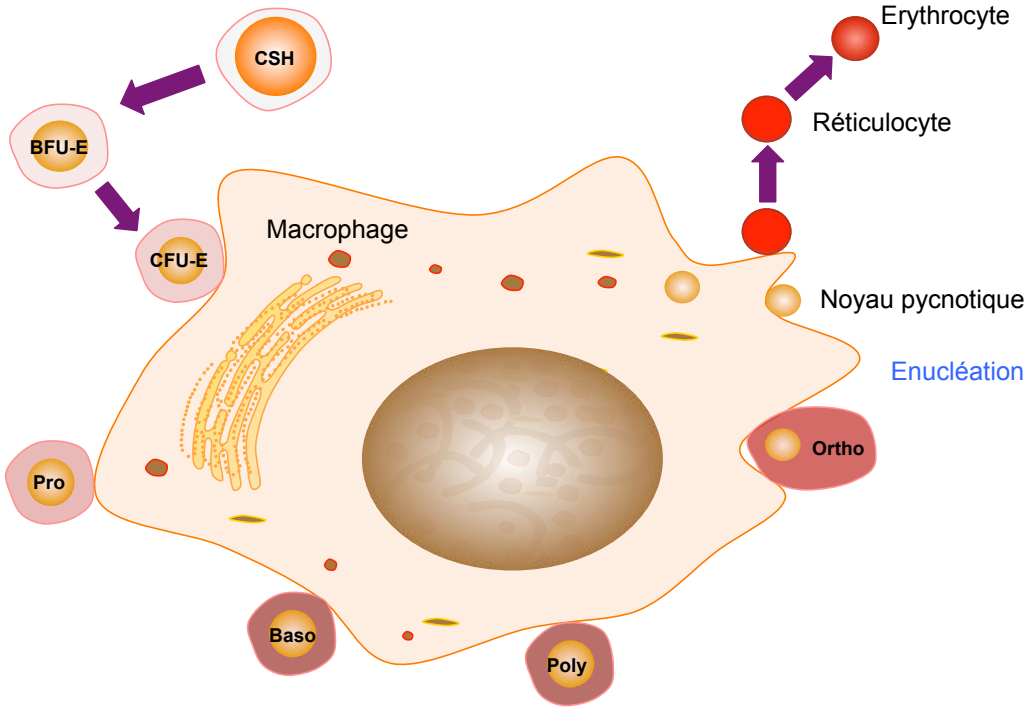


Figure 6 : Les îlots érythroblastiques Dans la moelle osseuse, l'érythropoïèse se déroule en étroite collaboration avec des macrophages, formant des îlots érythroblastiques. CSH : Cellule souche hématopoïétique ; BFU-E : Burst forming unit erythroid ; CFU-E : colony forming unit erythroid ; Pro: Proérythroblaste; Baso : Erythroblaste basophile ; Poly : Erythroblaste polychromatophile ; Ortho : Erythroblaste orthochromatophile (Adapté de (Ingley et al. 2004)).

Le proérythroblaste est une grosse cellule mesurant de 20 à 25 µm de diamètre, avec un gros noyau rond ou légèrement ovale, qui occupe environ 80% de la cellule. Le noyau présente un ou deux nucléoles. Dans ces cellules, le cytoplasme qui est basophile forme un rebord mince autour du noyau et la chromatine est finement granulaire.

Le stade suivant correspond aux érythroblastes basophiles, cellules plus petites, mesurant de 16 à 20 µm de diamètre. Le noyau est parfaitement rond et le nucléole disparaît. La chromatine se condense et l'hétérochromatine commence à apparaître. Le rapport nucléo-cytoplasmique reste élevé mais le cytoplasme très basophile, est plus abondant que dans le stade précédant. A ce stade, l'hémoglobine commence à être synthétisée. Ces cellules prolifèrent et donnent naissance aux érythroblastes polychromatophiles qui correspondent au premier stade d'érythroblastes matures. Ce sont de petites cellules de 10 à 15 µm de diamètre. La particularité de cette étape est l'accumulation progressive de l'hémoglobine dans le cytoplasme, réduisant ainsi sa basophilie. Le noyau qui est devenu plus petit et plus dense reste central. La chromatine est toujours très dense prenant la forme de « rayons de roue ». Ces cellules sont les dernières à avoir la capacité de proliférer.

Le stade suivant, formé par les érythroblastes acidophiles, est ultime car il correspond au dernier stade nucléé de la maturation érythroblastique. Les érythroblastes acidophiles sont de petites cellules de 8 à 9 µm de diamètre, guère plus grandes qu'une hématie. A ce stade, le cytoplasme est rempli d'hémoglobine. Le noyau est rond, pycnotique et légèrement excentré. L'expulsion du noyau donnera naissance à un réticulocyte. Les réticulocytes sont des petites cellules anucléées, acidophiles, ayant une forme irrégulière. Ces cellules se développent dans la moelle osseuse, puis vont circuler durant une journée dans le sang, avant de devenir des globules rouges matures ou érythrocytes. Ces cellules sont appelées réticulocytes car elles contiennent un réseau réticulaire (maille) de l'ARN ribosomal qui devient visible sous un microscope, après coloration par le bleu de Crésyl. La durée de vie d'un réticulocyte est d'environ trois jours.

Les érythrocytes sont de petites cellules d'environ 7 µm de diamètre, formant un disque biconcave. Ces cellules sont anucléées et ont un cytoplasme riche en hémoglobine, mais pauvre en organites. Leur fonction principale est d'assurer le transport du dioxygène (O_2). Une diminution du taux d'hémoglobine entraîne une anémie.

La caractérisation phénotypique de la différenciation érythroïde :

La différenciation érythroïde peut être caractérisée par l'expression du principal marqueur phénotypique, l'hémoglobine (Hb), et l'expression de marqueurs de surface spécifiques comme le CD36, le CD71 (récepteur à la transferrine), le récepteur à l'érythropoïétine (EpoR), la GPA (glycophorine A) (Nakahata et al. 1994; Robb 2007). Le marqueur CD34 est encore exprimé au stade très précoce de BFU-E mais sa disparition dès le stade CFU-E témoigne de la progression du processus de différenciation (Figure 7).

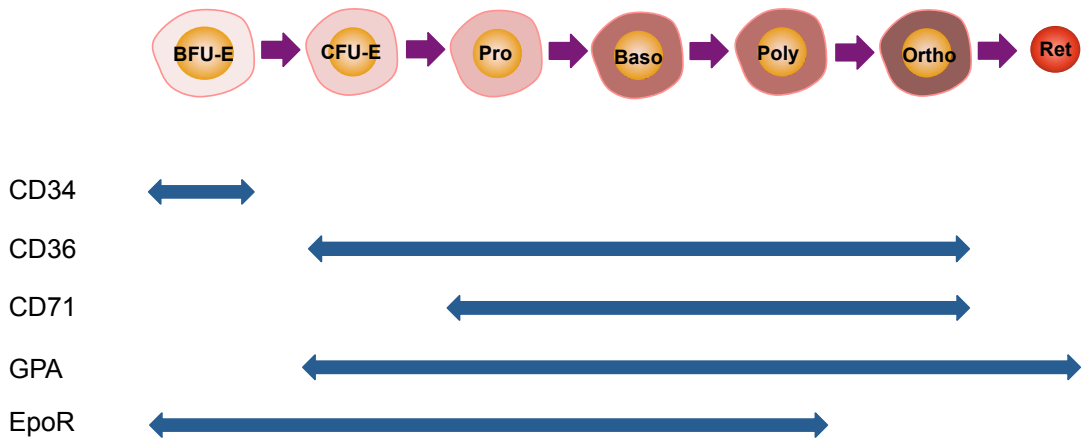


Figure 7 : Les principaux marqueurs de différenciation érythrocytaire

Les progéniteurs et les précurseurs érythroïdes expriment à leur surface des marqueurs nécessaires à la progression de la différenciation cellulaire. EpoR: récepteur à l'érythropoïétine; CD34: protéine d'adhésion exprimée par les progéniteurs hématopoïétiques; CD36: protéine d'adhésion exprimée principalement par les précurseurs érythroïdes; CD71: récepteur de la transferrine; GPA: Glycophorine A (Adapté de (Spivak 2005)).

- L'hémoglobine

L'hémoglobine est le constituant majeur des globules rouges. Dans un sens, elle sert au transport de l'oxygène des poumons vers les tissus et vice-versa, elle facilite le transport du dioxyde de carbone pour son élimination. Dans la circulation artérielle, qui va des poumons vers les tissus, l'hémoglobine a une forte affinité pour l'oxygène et une faible affinité pour le dioxyde de carbone, les phosphates organiques et les ions hydrogène et chlorure. Dans la circulation veineuse, ces affinités relatives sont inversées.

L'hémoglobine humaine est formée de quatre chaînes polypeptidiques de globines identiques deux à deux. 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 du gène codant pour la globine embryonnaire zêta ζ, suivi des globines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ qui sont des composants de l'hémoglobine adulte. La famille des globines β est constituée de la globine embryonnaire epsilon ε, suivi des gènes des globines fœtales γ (Gγ et Aγ) puis des gènes des globines adultes delta δ et beta β. La séquence des gènes de globines qui sont alignés le long des chromosomes, correspond à l'ordre dans lequel les différents gènes seront exprimés au cours du développement. Avant la naissance, le fœtus utilise l'hémoglobine fœtale (F) formée de deux chaînes alpha α et deux chaînes gamma γ ($\alpha 2\gamma 2$). Après la naissance, l'hémoglobine adulte (A) ($\alpha 2\beta 2$), est majoritaire (97%), alors que l'hémoglobine D ($\alpha 2\delta 2$) (2%) et l'hémoglobine F (1%) sont peu exprimées. Chaque chaîne polypeptidique est repliée selon une certaine conformation, lui donnant ainsi une forme globuleuse avec une poche dans laquelle vient se loger l'hème. L'hème est un cofacteur constitué d'une structure aromatique, la porphyrine, qui est associée à un ion ferreux Fe^{2+}. Chacun des quatre ions Fe^{2+}, présents dans une molécule d'Hb, se combine de façon réversible à une molécule d'oxygène O_2. La transferrine est une β-globuline qui assure le transport du fer sous forme d'ions ferriques (Fe^{3+}) dans le sang. Le foie est le site principal de la synthèse de la transferrine, mais d'autres tissus et organes, tels que le cerveau, peuvent également la produire (Macedo et al. 2008). Son rôle principal est de fournir les ions Fe^{3+} aux érythrocytes. La transferrine peut pénétrer dans les érythroblastes par endocytose grâce à des récepteurs membranaires (CD71). Le recyclage du fer est finement régulé et contrôlé par l'hepcidine qui est une hormone peptidique produite par le foie (Nicolas et al. 2002; Beaumont et al. 2005).

Cette dernière régule l'homéostasie du fer chez les humains tout en maintenant des niveaux normaux de fer dans l'organisme.

- L'érythropoïétine

L'érythropoïétine (Epo) est essentielle à l'activation de l'érythropoïèse et à la maturation des progéniteurs érythroïdes ainsi qu'au maintien de l'approvisionnement des tissus en oxygène. Cette glycoprotéine circulante, de 165 acides aminés, est principalement produite dans le foie chez le fœtus et par les cellules interstitielles (fibroblastes) du rein après la naissance. La production d'Epo est finement régulée au niveau transcriptionnel par le facteur de transcription HIF (Hypoxia Inducible Factor). L'expression du gène Epo est sous la dépendance d'un site « enhancer » situé en 3' de son signal de polyadénylation. Dans des conditions d'hypoxie (diminution du taux d'oxygène dans le sang), le complexe transcriptionnel HIF est capable de se fixer sur cet « enhancer » pour activer l'expression du gène Epo. Dans les conditions de normoxie (concentration physiologique d'oxygène dans le sang), ce gène est réprimé par le facteur de transcription GATA-2. Par contre, dans les conditions d'hypoxie, l'expression de GATA-2 diminue, ce qui active l'expression du gène de l'Epo (Jelkmann 2011).

L'interaction de l'Epo avec son récepteur (EpoR) entraîne une cascade de signalisation qui induit la différenciation des progéniteurs érythroïdes en CFU-E.

Le récepteur à l'Epo est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 ayant pour ligand naturel l'Epo. L'Epo se fixe à son récepteur *via* deux sites, l'un de haute affinité (ordre du nanomolaire) et l'autre de faible affinité (ordre du micromolaire) entraînant ainsi la configuration dimérique, unique du récepteur. Une protéine accessoire principale, Janus kinase 2 (JAK2), essentielle pour la signalisation de EpoR, se lie au récepteur lors de la maturation de la protéine dans le réticulum endoplasmique. L'homodimérisation du récepteur en présence d'Epo, entraîne la transphosphorylation des protéines kinases JAK2 sur des résidus tyrosine qui se trouvent à l'intérieur de la région cytoplasmique de l'EpoR. Ces sites phosphorylés servent d'ancrage pour le facteur de transcription « Signal Transducer and Activator of Transcription » STAT-5 et des kinases comme la PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) et la MAP kinase (MAPK) qui seront elles-mêmes activées par phosphorylation. La protéine kinase C (PKC) régule la formation du dimère suite à la fixation du ligand et elle est nécessaire pour la phosphorylation et l'activation du

réceptur. L'activation de ces voies de signalisation va promouvoir la survie, la différenciation et la prolifération des progéniteurs érythroïdes (Sinclair 2013). Un certain nombre de molécules ont été impliquées dans la régulation négative de la signalisation de l'EpoR, comme Src homology phosphatase-1 (SHP-1), Suppressors of cytokine signalling (SOCS)-1 et SOCS-3. L'absence de régulation négative de la signalisation de l'EpoR peut être associée à une polyglobulie familiale (Sasaki et al. 1999; Yasukawa et al. 2000).

1.2.2 La mégacaryopoïèse

La mégacaryopoïèse constitue l'ensemble des mécanismes qui conduisent à la différenciation des thrombocytes ou plaquettes. Chez l'adulte, 10^{11} plaquettes sont produites par jour à l'état normal et la production peut augmenter de 20 fois ou plus en cas de saignement ou d'inflammation. Les plaquettes sont des petits fragments de cellules anucléées de 1 à 3 µm de diamètre. Les plaquettes, qui, historiquement faisaient référence à « la poussière du sang », sont indispensables lors des processus d'homéostasie, de cicatrisation, d'angiogenèse, d'inflammation et d'immunité innée (Kaushansky 2008).

La caractérisation morphologique de la différenciation mégacaryocytaire :

La mégacaryopoïèse s'effectue dès la naissance dans la moelle osseuse. Il s'agit d'un système de différenciation tout à fait original dans lequel les plaquettes sont générées par des cellules géantes, les mégacaryocytes, par fragmentation de leur cytoplasme. Les mégacaryocytes proviennent de progéniteurs communs à l'érythropoïèse et à la mégacaryopoïèse, les PME, qui se différencient en BFU-MK (Burst Forming Unit-Megakaryocyte) puis en CFU-MK (Colony Forming Unit-Megakaryocyte). Les CFU-MK génèrent les pro-mégacaryoblastes puis les mégacaryoblastes (ou mégacaryocyte stade I). Les mégacaryoblastes se différencient ensuite en promégacaryocytes puis en mégacaryocytes qui donneront par la suite les plaquettes (Figure 8). Au cours de la maturation, le noyau rond s'invagine puis devient polylobé et la chromatine se condense. Le cytoplasme se modifie et devient basophile (mégacaryocyte basophile ou mégacaryocyte stade II), s'enrichit en granulations (mégacaryocyte granuleux ou

mégacaryocyte stade III) puis libère des plaquettes par fragmentation (mégacaryocyte plaquettaire).

Les BFU-MK et les CFU-MK sont identifiables grâce à des antigènes membranaires spécifiques (Figure 9) (Chang et al. 2007). Les BFU-MK expriment les marqueurs CD34 et CD117 et les CFU-MK expriment les marqueurs CD34, CD38 et CD33. Les pro-mégacaryoblastes expriment les marqueurs CD33, CD41, CD61 et contiennent de la peroxydase plaquettaire (PPO). Les mégacaryoblastes et les mégacaryocytes expriment les marqueurs CD41, CD61, CD42a et CD42b.

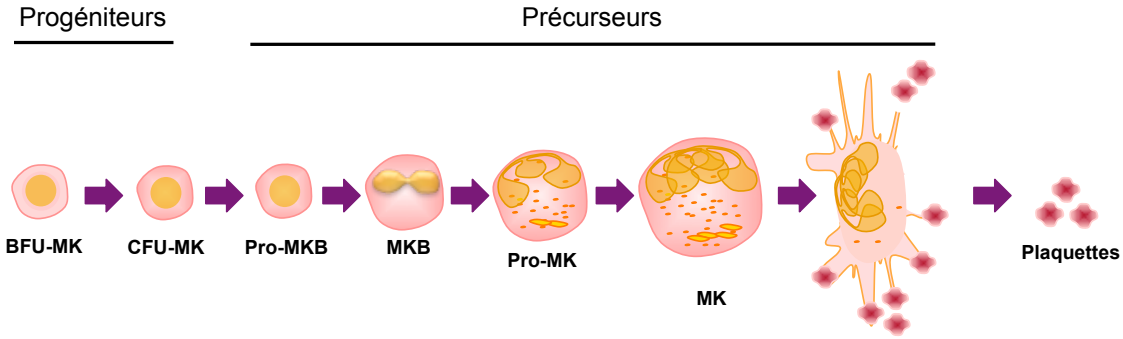


Figure 8 : La mégacaryopoïèse

La mégacaryopoïèse est le processus qui conduit à la production des plaquettes, à partir d'une cellule progénitrice myéloïde. Au cours de la différenciation mégacaryocytaire des changements morphologiques apparaissent : le noyau rond s'invagine puis devient polylobé et la chromatine se condense. Le cytoplasme devient basophile puis granuleux pour ensuite se fragmenter et libérer les plaquettes. BFU-MK : Burst forming unit-Megakaryocyte ; CFU-MK : colony forming unit-Megakaryocyte ; Pro-MKB: Pro-mégacaryoblaste; MKB : Mégacaryoblaste ; Pro-MK : Pro-mégacaryocyte ; MK : Mégacaryocyte (Adapté de (Chang et al. 2007).

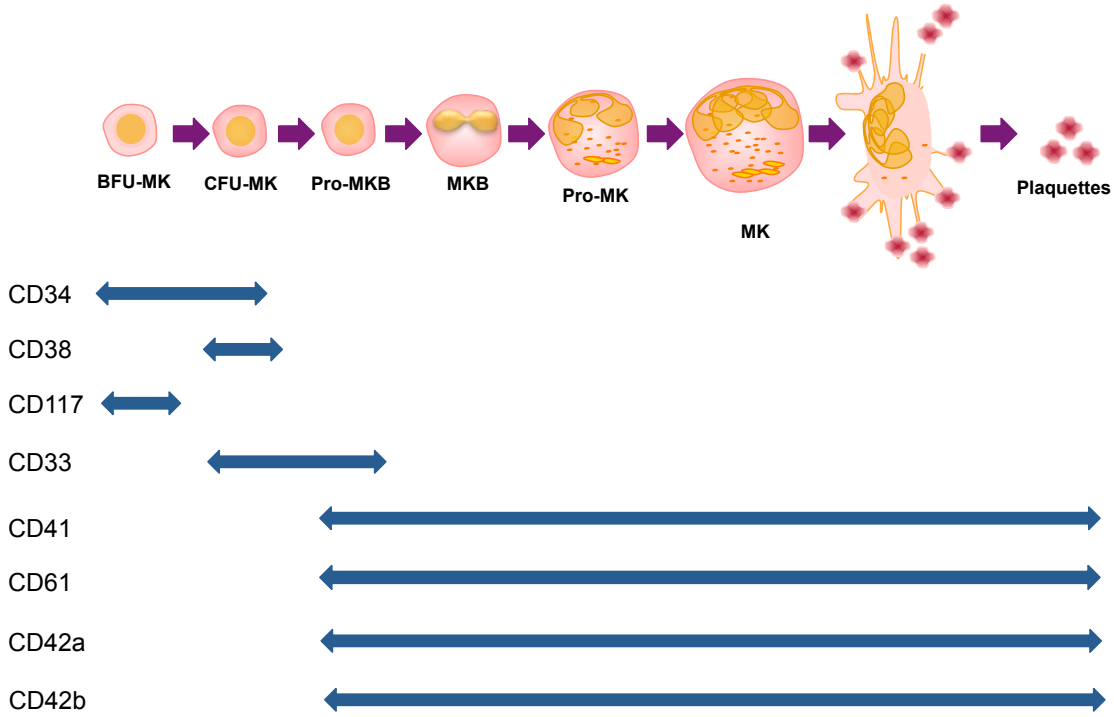


Figure 9 : Les principaux marqueurs de différenciation mégacaryocytaire

Les progéniteurs et les précurseurs mégacaryocytaires expriment à leur surface des marqueurs nécessaires à la progression de la différenciation cellulaire. CD34: protéine d'adhésion exprimée par les progéniteurs hématopoïétiques; CD38, CD117 : Récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase, c-kit, CD33, CD41 : GPIIb/IIIa, CD61 : GPIIIa, CD42a/CD42b : GPIX/GPIb (Adapté de (Chang et al. 2007).

La régulation de la mégacaryopoïèse au niveau cellulaire :

Trois paramètres cellulaires indépendants régulent la mégacaryopoïèse (Geddis 2010) :

- Le nombre de mégacaryocytes dans la moelle osseuse
- Le volume des mégacaryocytes et leur ploïdie avec un taux d'ADN pouvant varier par endomitose de 2N à 64N voire 128N, avec augmentation parallèle de la production plaquettaire.
- La maturation cytoplasmique des mégacaryocytes nécessite le développement d'un réseau important de membranes internes (membranes de démarcation) qui serviront ensuite de membranes cytoplasmiques aux plaquettes.

Les facteurs humoraux de régulation ont une action qui peut être précoce. Le GM-CSF et l'IL3 induisent la formation de colonies mégacaryocytaires en stimulant les progéniteurs BFU-MK et CFU-MK. Le Stem Cell Factor (SCF) exerce également un effet synergique avec l'IL-3 et le GM-CSF en augmentant le nombre et la taille des colonies mégacaryocytaires (Kaushansky 2008). D'autres facteurs agissent plus tardivement comme la thrombopoïétine (TPO) qui est un facteur humoral de croissance essentiel à la mégacaryopoïèse. La TPO agit sur la polyploïdisation, la maturation cytoplasmique, la fragmentation et la production des plaquettes. Ce facteur se lie à un récepteur spécifique, restreint à la lignée mégacaryocytaire et codé par un proto-oncogène c-mpl (Wendling et al. 1996). Des études ont montré que l'activité biologique de la TPO vis-à-vis de la mégacaryopoïèse est inversement corrélée à la numération des plaquettes circulantes. D'autres facteurs de croissance contribuent à une production normale des plaquettes par la moelle osseuse comme l'IL-6 qui augmente la taille, la ploïdie et la maturation cytoplasmique et l'Epo qui exerce aussi un rôle au niveau de la maturation.

1.2.3 La régulation de la différenciation érythro/mégacaryocytaire au niveau moléculaire

1.2.3.1 Les facteurs de transcription

Les facteurs de transcription (FT) jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'hématopoïèse (Orkin, 2000) (Figure 10). Le mécanisme d'action des FT nécessite :

- Un domaine de liaison à l'ADN leur permettant de se fixer à une séquence spécifique située généralement en amont des sites d'initiation de la transcription des gènes-cibles à transcrire. Toutes les conformations de FT permettant leur liaison à l'ADN, « doigts de zinc / zinc fingers », « Hélice-boucle-hélice basique / basic-helix-loop-helix », « fermeture-éclair à leucine / basic leucine zipper » et homéodomaines connus, sont retrouvées dans l'hématopoïèse.
- Un domaine transactivateur qui permet le recrutement de co-régulateurs transcriptionnels pouvant être activateur ou répresseur. Ces co-régulateurs peuvent agir directement sur la transcription en recrutant la machinerie transcriptionnelle sur les promoteurs, ou agir sur l'état de condensation de la chromatine en acétylant ou désacétylant spécifiquement certains résidus lysines des histones. L'acétylation ou la désacétylation des résidus aura respectivement, un effet activateur ou répresseur sur la transcription.

<u>Les facteurs de la famille GATA</u>

Les facteurs de transcription à doigts de zinc de la famille GATA, ont émergé comme des régulateurs de l'expression des gènes dans les cellules hématopoïétiques. Ces facteurs de transcription reconnaissent une séquence consensus WGATAR où W représente les bases azotées adénine (A) ou Thymine (T) et R représente les bases azotées adénine (A) ou guanine (G) (Merika et al. 1993). Les structures en doigt de zinc sont aussi impliquées dans les interactions protéine/protéine. Six membres de cette famille ont été identifiés chez les vertébrés. Chacun possède un domaine de liaison à l'ADN hautement conservé, avec deux doigts de zinc ayant pour motif Cys-X2-Cys-X17-Cys-X2-Cys, dans lesquels les quatre résidus cystéine (Cys) sont liés à un atome de zinc central. Sur base de leurs profils d'expression, les protéines GATA ont été divisées en deux sous-familles : Les facteurs GATA-1, -2, et -3 sont exprimés dans les cellules hématopoïétiques alors que GATA-4, -5, -6 sont exprimés dans

différents tissus dérivés du mésoderme et de l'endoderme, tels que le cœur, le foie, le poumon, la gonade, et l'intestin (Molkentin 2000).

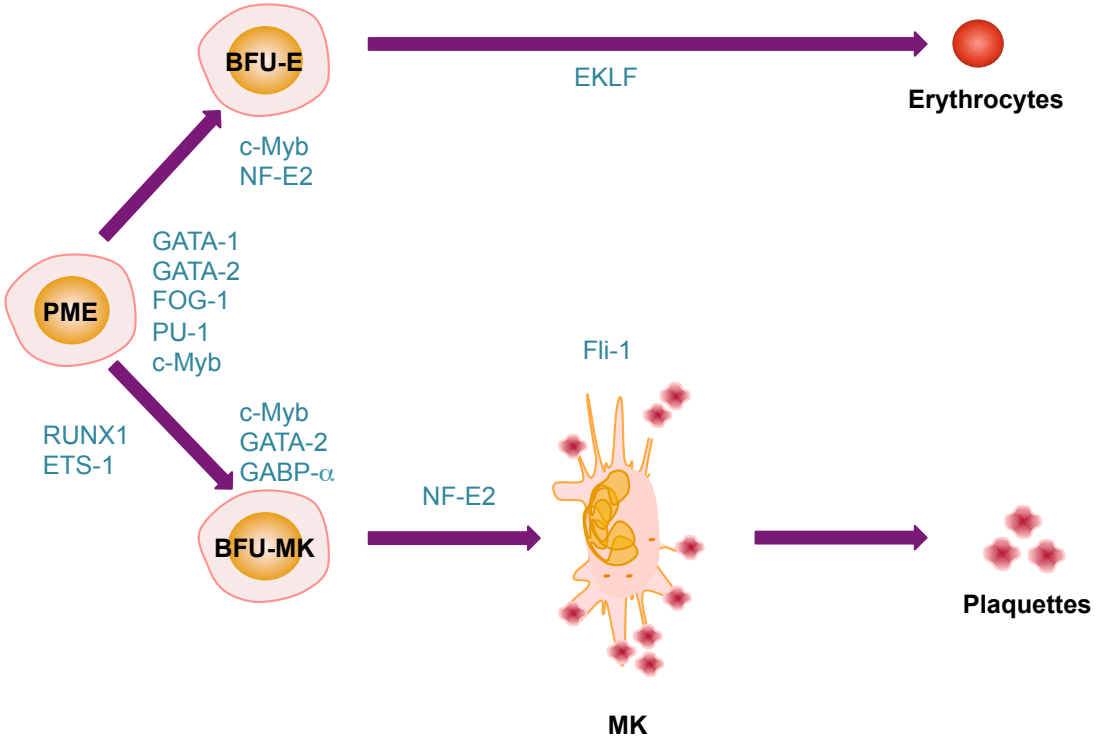


Figure 10 : Les principaux facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse et de la mégacaryopoïèse.

La décision de l'engagement du progéniteur PME (Progéniteur Mégacaryo-Erythroïde) vers la voie érythroïde qui donne naissance aux érythrocytes ou vers la voie mégacaryocytaire qui donne naissance aux plaquettes, est régulée par des facteurs de transcription. MK : Mégacaryocytes (Adapté de (Dore et al. 2011)).

GATA-1 :

Le facteur de transcription GATA-1 joue un rôle crucial dans le bon déroulement de l'érythropoïèse, notamment lors des phases tardives (Pevny et al. 1995) mais aussi lors de la différenciation des mégacaryocytes, des granulocytes éosinophiles et des mastocytes. La protéine contient une région N-terminale qui lui confère une activité de transcription et un domaine C-terminal qui permet la liaison à l'ADN et à d'autres facteurs. La séquence G-A-T-A spécifiquement reconnue par les FT GATA comme un site de liaison, est très largement représentée au niveau des promoteurs des gènes de globines et de la plupart des autres gènes spécifiques de la voie érythroïde comme les enzymes du métabolisme de l'hème, de la GPA, de l'EpoR mais aussi du gène anti-apoptotique Bcl-x_L (Gregory et al. 1999). De plus, les sites de liaison du facteur GATA-1 sont également retrouvés sur les promoteurs de gènes spécifiquement impliqués dans la différenciation mégacaryocytaire, comme gpIX, gpIIb, c-mpl (Szalai et al. 2006).

Dans les cellules humaines érythroïdes, il existe deux isoformes différentes de GATA-1 résultant de sites d'initiation alternatifs de la traduction (Calligaris et al. 1995). Le gène codant pour l'ARNm de GATA-1 est capable de donner une protéine complète de 47 kDa et une protéine plus courte de 40kDa appelée GATA-1s. GATA-1s diffère de GATA-1 par l'absence de 83 acides aminés au niveau de la région N-terminale. Les 2 isoformes ont montré une activité de liaison à l'ADN pratiquement identique mais GATA-1s possède une activité transcriptionnelle moins importante que la protéine de pleine longueur. Le domaine C-terminal, qui est présent dans les deux isoformes, permet l'association avec d'autres protéines, qui possèdent également un domaine en « doigt de zinc ». En effet, GATA-1 est capable d'interagir avec d'autres protéines nucléaires et ces interactions entraînent l'activation ou la répression de l'expression des gènes-cibles lors de la différenciation érythroïde (Morceau et al. 2004) ou mégacaryocytaire (Elagib et al. 2003).

Parmi les différentes protéines interagissant avec GATA-1, le cofacteur « Friend of GATA » (FOG)-1 est essentiel à tous les stades de la différenciation érythro-mégacaryocytaire. Cette protéine de 998 acides aminés, largement exprimée dans les cellules érythroïdes et mégacaryocytaires, contient neuf doigts de zinc (Tsang et al. 1997). Quatre d'entre eux sont capables d'interagir avec GATA-1 de façon individuelle. Lors du développement embryonnaire, FOG-1 est co-exprimé avec

GATA-1. L'interaction entre ces deux protéines est essentielle pour le bon déroulement de l'érythropoïèse et de la mégacaryopoïèse (Dore et al. 2011). La réalisation du test de double hybride chez la levure (Tsang et al. 1997), a montré que FOG-1 interagissait avec GATA-1, en se liant au doigt de la partie N-terminale de ce dernier, montrant ainsi que FOG-1 agit comme un cofacteur de GATA-1. D'autres travaux ont montré que le facteur de remodelage de la chromatine, NuRD, interagit avec l'extrémité N-terminale de FOG-1 et que cette interaction est importante pour l'activation ou la répression des gènes régulés par GATA-1/FOG-1 (Miccio et al. 2010). Lors de la différenciation mégacaryocytaire, l'interaction entre NuRD et GATA-1/FOG-1 est requise pour le bon développement des mégacaryocytes.

Outre FOG-1, de nombreuses protéines qui interagissent entre elles peuvent former des complexes autour de GATA-1 pour moduler son activité transcriptionnelle. Lmo2 (Lim-only protein 2) est une protéine à « doigt de zinc » capable d'interagir avec GATA-1, Tal-1 (T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1), TCF3 (E2A immunoglobulin enhancer-binding factors E12/E47) et Ldb1 (LIM domain-binding protein 1) pour former un complexe protéique capable de se lier à l'ADN pour activer la transcription des gènes érythroïdes cibles (Wadman et al. 1997). Dans ce complexe, SCL est indispensable pour le développement érythrocytaire mais aussi pour le développement mégacaryocytaire (Wen et al. 2011).

L'acétylation de la protéine GATA-1 est une modification post-traductionnelle importante pour son activité. La réalisation d'une expérience d'immuno-précipitation sur des extraits nucléaires de cellules érythroïdes, a montré que GATA-1 est capable d'interagir avec CREB-binding protein (CBP) (Blobel et al. 1998). La protéine p300 associée possède une activité acétyl transférase qui est capable d'acétyler GATA-1, permettant la fixation de ce facteur de transcription à l'ADN et l'activation de son activité transcriptionnelle.

GATA-2 :

Le facteur de transcription GATA-2 est exprimé par les progéniteurs hématopoïétiques, incluant les cellules érythroïdes précoces, les mastocytes, les mégacaryocytes, ainsi que les cellules souches embryonnaires non hématopoïétiques. Outre son rôle dans la régulation des voies de différenciation, GATA-2 est exprimé précocement dans les CSH où il joue un rôle important dans l'activation de la prolifération cellulaire. La surexpression de GATA-2 entraîne la différenciation

mégacaryocytaire des cellules au détriment de la différenciation érythroïde. Dans les cellules érythroïdes matures, l'expression de GATA-2 est rapidement diminuée par l'activation de GATA-1 (Ikonomi et al. 2000). En effet, GATA-1 et GATA-2 sont des facteurs de transcription appartenant à la même famille mais qui ont des profils d'expression opposés au cours de la différenciation érythroïde. Il existe un véritable modèle de régulation dynamique entre GATA-1 et GATA-2 (Ferreira et al. 2005). Dans le cas des progéniteurs immatures, le facteur de transcription GATA-2 est exprimé et l'expression de GATA-1 est inhibée. GATA-2 est capable d'activer la transcription de son propre gène. Par contre aux stades précoces de la différenciation érythroïde, GATA-2 est capable d'activer la transcription de GATA-1 et au cours du développement, GATA-1 pourra réprimer l'expression du gène GATA-2. Au cours du développement érythroïde, GATA-1 présente donc un pic d'expression aux stades CFU-E et proérythroblaste. A ce stade, GATA-1 remplace GATA-2 sur le promoteur du gène de GATA-2 et inhibe son expression (Figure 11) (Bresnick et al. 2010). L'échange entre les facteurs GATA nécessite l'interaction de GATA-1 avec le co-facteur transcriptionnel FOG-1. Afin de moduler la transcription des gènes ciblés par les facteurs GATA, le facteur FOG-1 peut recruter d'autres cofacteurs au complexe GATA-1/FOG-1, comme par exemple le complexe de remodelage de la chromatine NuRD. L'interaction entre NuRD et FOG-1 fournit un mécanisme qui mène à la répression des gènes régulés par GATA-1 (Vicente et al. 2012).

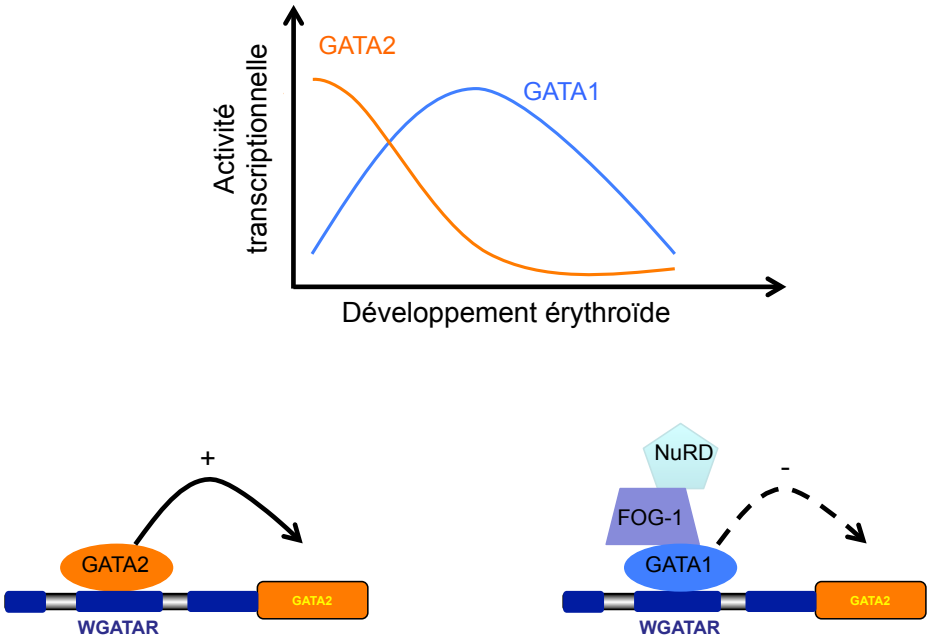


Figure 11 : La balance GATA-1/GATA-2 impliquée dans la régulation de l'érythropoïèse

GATA-2 est exprimé dans les progéniteurs immatures. Il joue un rôle dans la régulation de sa propre expression, en se liant au niveau du promoteur de son gène et en activant sa transcription. Pendant la différenciation érythroïde, l'expression de GATA-1 présente un aux stades CFU-E et proérythroblastes. Lorsque GATA-1 est exprimé, il va remplacer GATA-2 au niveau du promoteur du gène de GATA-2 et donc inhiber la transcription de GATA-2. L'échange entre les facteurs GATA requiert l'interaction de différentes protéines comme GATA-1 avec FOG-1 et de FOG-1 avec NuRD (Adapté de (Vicente et al. 2012)).

Les facteurs de la famille ETS :

Les facteurs de transcription appartenant à la famille ETS (E26 transformation-specific) sont impliqués dans la régulation de la différenciation érythro-mégacaryocytaire. Le facteur PU.1 (Spi1) est un des principaux régulateurs hématopoïétiques, ayant un rôle particulier lors de la différenciation myéloïde et lymphoïde. Le niveau d'expression de PU.1 varie de manière dynamique au cours de l'hématopoïèse afin d'orienter les CSH vers l'une ou l'autre des voies de différenciation hématopoïétique. PU.1 est surexprimé dans les macrophages et les lymphocytes B alors qu'il est exprimé à des niveaux plus faibles, dans les cellules érythroïdes matures, les mégacaryocytes et dans les cellules T. L'expression inappropriée de PU.1, dans les cellules hématopoïétiques spécifiques, peut conduire à une transformation leucémique, comme dans le cas des lymphomes à cellules T ou des érythroleucémies (Moreau-Gachelin et al. 1996; Rosenbauer et al. 2004). Des travaux ont montré que GATA-1 et PU.1 peuvent interagir physiquement et s'inhiber mutuellement. La partie N-terminale et C-terminale de PU.1 peuvent interagir physiquement avec la partie C-terminale de GATA-1. Il est connu que la partie N-terminale de PU.1, contenant 70 acides aminés, mais pas la partie C terminale, est requise pour bloquer spécifiquement la liaison de GATA-1 à l'ADN (Zhang et al. 2000).

Outre PU.1, d'autres facteurs ETS sont impliqués dans la différenciation érythro-mégacaryocytaire. Fli-1 est un régulateur positif de la mégacaryopoïèse (Hart et al. 2000) alors qu'il régule la différenciation érythroïde de manière négative (Athanasiou et al. 2000). GABP-α est un régulateur des gènes spécifiques qui sont exprimés pendant les stades précoces de la mégacaryopoïèse. Il régule l'expression des gènes αIIb et de c-mpl (Pang et al. 2006). Au cours de la maturation, le ratio GABP-α/Fli-1 diminue ce qui est bien corrélé à la régulation de l'expression des gènes précoces par GABP-α et des gènes tardifs par Fli-1.

ETS-1 est surexprimé lors du développement mégacaryocytaire et sa surexpression dans les cellules $CD34^+$, entraîne la différenciation des cellules vers la voie mégacaryocytaire, au détriment de l'érythropoïèse (Dore et al. 2012).

Les autres facteurs de transcription

EKLF (Erythroid Kuppel-Like Factor) :

EKLF est une protéine à trois « doigts de zinc » qui se lie aux boîtes de séquences « CACCC », situées à 90 et 105 nucléotides du site d'initiation de la transcription. Ces sites caractérisent les promoteurs de gènes érythroïdes. Au niveau du promoteur de la globine β, GATA-1 fixe et active EKLF (Gregory et al. 1996). Pendant l'érythropoïèse, ce facteur régule les progéniteurs érythroïdes notamment lors de leur engagement vers la voie érythroïde. Lorsque des gènes érythroïdes spécifiques sont exprimés, le facteur EKLF est impliqué lors de la transition de l'expression des globines. Ce facteur peut aussi jouer un rôle lors de la maturation terminale, lorsque les cellules sortent du cycle cellulaire (Siatecka et al. 2011).

NF-E2 (Nuclear Factor Erythroid 2) :

Ce facteur de transcription est un hétérodimère formé par la sous-unité p45 et la petite sous unité Maf (p18). NF-E2 est exprimé par les cellules érythroïdes, mégacaryocytaires et des mastocytes. Concernant la voie mégacaryocytaire, des travaux ont montré le rôle critique de ce facteur de transcription pour la production des plaquettes par les mégacaryocytes. En effet, NF-E2 régule l'expression de deux gènes, Selp et Myl9, spécifiquement requis pour la production plaquettaire (Fujita et al. 2013). Des travaux portant sur la voie érythroïde ont montré que NF-E2 active la transcription du gène de la γ-globine (Woon Kim et al. 2011). La surexpression de NF-E2 peut également retarder la phase précoce de la maturation érythroïde, ce qui entraîne une expansion de progéniteurs érythroïdes, amplifiant ainsi le nombre d'érythrocytes dérivés d'une cellule $CD34^+$ (Mutschler et al. 2009).

RUNX1 (Runt-related transcription factor 1) :

RUNX1 et son cofacteur CBFβ (Core Binding Factor β) sont fortement exprimés pendant la différenciation mégacaryocytaire des PME (Progéniteur Mégacaryo-Erythroïde) et leur expression est diminuée pendant les phases précoces de l'érythropoïèse. Ce facteur de transcription interagit également avec GATA-1 lors de l'activation des promoteurs de gènes impliqués dans la mégacaryopoïèse (Elagib et al. 2003). L'absence d'expression de RUNX1 a un effet important sur la différenciation mégacaryocytaire terminale entraînant ainsi, la formation des plaquettes *in vivo*.

c-Myb :

Le proto-oncogène c-Myb, est un régulateur essentiel de l'hématopoïèse, qui agit sur la croissance, la survie, la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques. C-Myb joue un rôle essentiel dans l'engagement des cellules souches vers la voie mégacaryocytaire ou érythrocytaire. c-Myb et GATA-1 interagissent afin d'assurer une différenciation mégacaryocytaire correcte. Le facteur c-Myb influençe également les progéniteurs vers cette voie de différenciation, mais à la différence de GATA-1, il n'a pas d'effet sur le processus de différenciation terminale (Garcia et al. 2011). Concernant la différenciation érythroïde, c-Myb intervient au niveau des stades précoces de l'érythropoïèse. Son expression est élevée dans les CFU-E et dans les érythroblastes. Dans les cellules érythroleucémiques, qui sont bloquées au stade CFU-E, c-Myb peut agir comme un inhibiteur de la différenciation érythroïde terminale (Vegiopoulos et al. 2006).

1.2.3.2 Les microARN

- Généralités :

Les microARN (miR) sont décrits comme de petits ARN non codant de 20 à 22 bases capables de s'apparier à des séquences complémentaires dans la région 3'-non traduite (3'NT) des ARNm. Ils régulent ainsi l'expression des gènes principalement par la répression de la traduction mais aussi dans certains cas en favorisant la dégradation des ARNm. Chez l'Homme, 30% des gènes sont régulés par les miR. Leur découverte est récente puisque le premier miR a été décrit en 1993 dans le nématode *Caenorhabditis elegans*. Cet ARN non codant appelé lin-4 module l'expression du gène lin-14, codant pour une protéine impliquée dans le développement chez *C. elegans* (Lee et al. 1993). Il est de plus en plus évident que les miR jouent un rôle central dans la plupart des processus cellulaires et en particulier au cours du développement embryonnaire (Byon et al. 2012).

Les mécanismes moléculaires qui permettent de coordonner l'engagement des cellules souches vers les différentes voies de différenciation jusqu'à la maturation terminale restent peu connus. Considérés comme une nouvelle classe de régulateurs (séquence-spécifique) de l'expression génique, les miR peuvent former un réseau de régulation avec des facteurs de croissance et des facteurs de transcription afin de contrôler les processus de différenciation cellulaire, de la cellule souche à la cellule mature (Zhan et al. 2007). Différents miR sont exprimés par les cellules hématopoïétiques et en particulier dans les cellules érythroïdes.

- Localisation génique :

Les gènes codant pour les miR sont localisés dans les régions intergéniques, au niveau des introns ou des exons. Certains miR sont retrouvés dans des unités géniques indépendantes et possèdent leurs propres promoteurs (Figure 12A). D'autres miR sont retrouvés dans des unités géniques qui codent pour les pré-ARNm, au niveau des introns ou des exons (Figure 12B). Dans ce cas, ils sont sous le contrôle du promoteur du gène qui les porte. Les miR peuvent être sous forme monocistronique ou polycistronique. Généralement, les miR provenant des polycistrons, ont un niveau d'expression similaire (Liang et al. 2007; Ozsolak et al. 2008), mais certaines stratégies peuvent exister pour découpler l'expression des miR d'un même groupe ou

« cluster » (Sun et al. 2009). Chez l'homme, 88% des miR seraient dans des introns, 10% dans des exons et 2% chevaucheraient un exon et un intron.

- Biogénèse des miR :

À ce jour, plus de 2000 miR matures ont été identifiés (d'après miRBase) chez l'Homme. La plupart des miR sont transcrits par l'ARN polymérase II. Comme tout autre ARN, ils sont transcrits sous le contrôle de facteurs de transcription pour produire dans un premier temps les miR primaires (pri-miR). Dans le noyau, les pri-miR sont clivés à la base de la structure en tige-boucle, par une ribonucléase nucléaire de la famille des ARNases III, Drosha liée à son cofacteur Pasha. Un pri-miR peut contenir plusieurs structures en tige boucle. Le clivage d'un pri-miR donne naissance à des pré-miR sous forme de duplex d'ARN d'une longueur d'environ 70 bases. Les pré-miR sont ensuite exportés vers le cytoplasme par l'exportine 5 et son cofacteur Ran-GTP, où ils vont subir des transformations pour aboutir au miR mature. La première transformation consiste à éliminer la boucle qui caractérise le pré-miR et à séparer le double brin par un complexe protéique, DICER. Un autre complexe, RISC (RNA-induced silencing complex), permet de tronquer les miR simple brin ainsi obtenus pour produire le miR mature qui pourra s'apparier à la région 3'NT de l'ARNm cible, avec une complémentarité plus ou moins parfaite (Figure 13).

Une autre voie de production minoritaire des miR implique la machinerie d'épissage. Dans ce cas, le miR appelé mirtron, est situé dans les introns des gènes codant pour un ARNm. Ces introns sont appelés mirtrons puisqu'ils sont traités par la machinerie d'épissage. Après l'épissage, l'intron n'est pas dégradé mais se structure en tige-boucle pour former le pré-miR (Westholm et al. 2011).

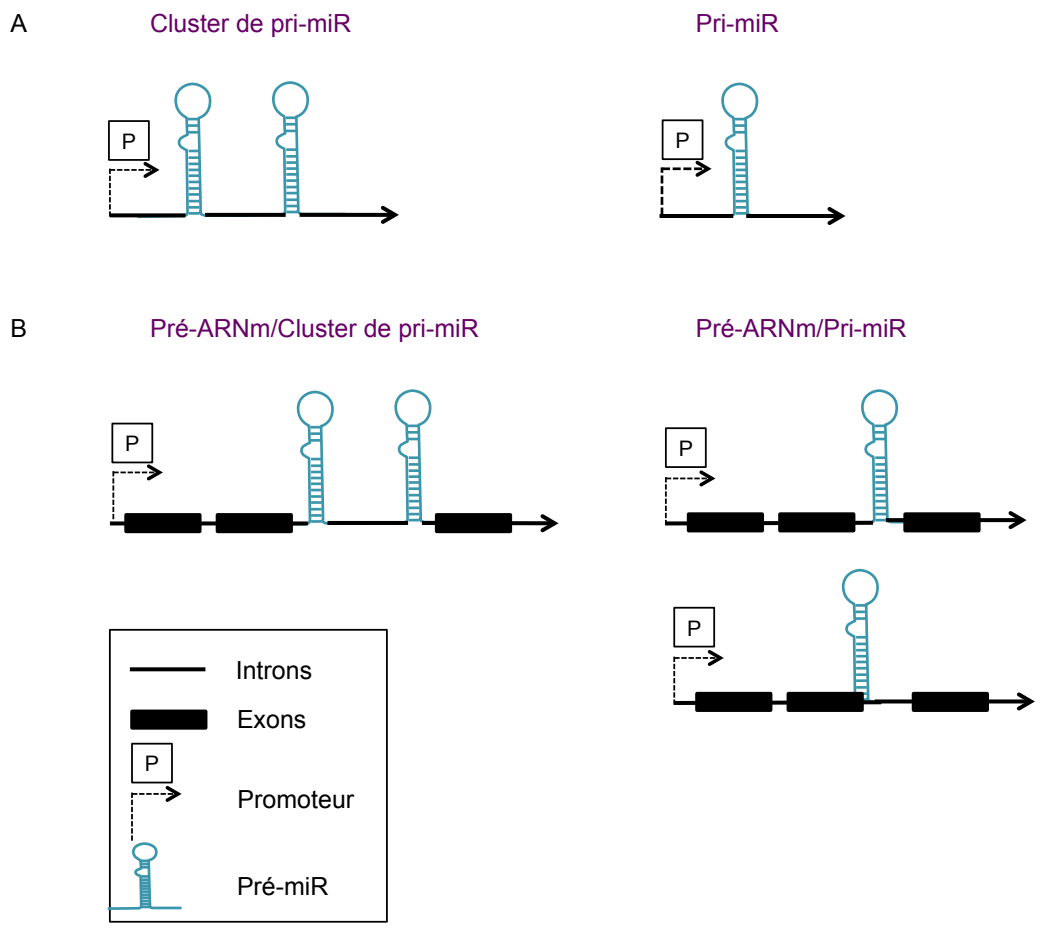


Figure 12 : Localisation génomique des miR

A. Les miR peuvent être codés dans des unités géniques indépendantes soit sous forme polycistronique (plusieurs tige-boucles, Cluster de pri-miR), soit sous forme monocistronique (une seule tige-boucle, Pri-miR).

B. Les miR peuvent se retrouver dans des unités géniques codant des pré-ARNm, sous forme de cluster ou non (Adapté de (Ul Hussain 2012)).

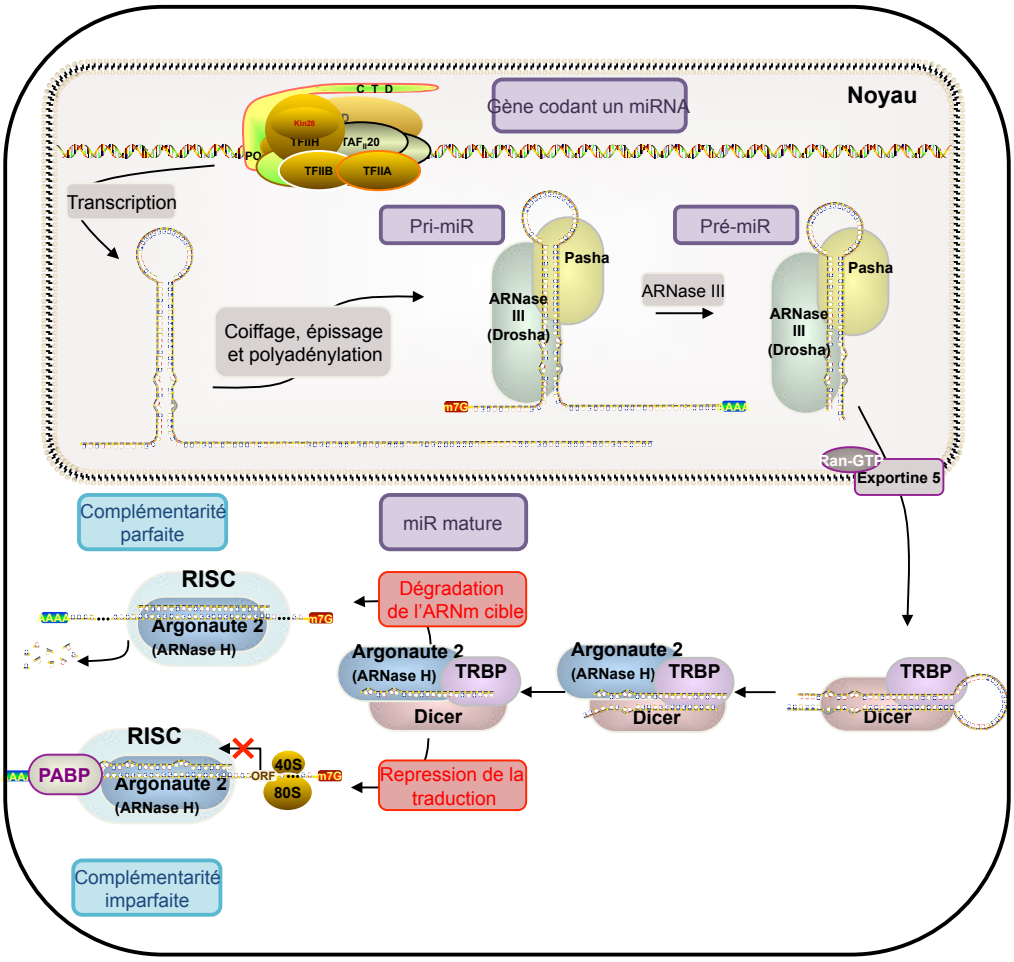


Figure 13 : La biogénèse des miR

Les gènes qui codent pour les miR sont transcrits par l'ARN polymérase II (Pol II) dans le noyau sous forme d'un long transcrit ou pri-miR. Dans le noyau, le transcrit est clivé par une ARNase III (Drosha) et son cofacteur Pasha pour produire un pré-miR d'environ 70 nucléotides. Le pré-miR est exporté vers le cytoplasme sous l'action de l'exportine 5 et son cofacteur Ran-GTP. Dans le cytoplasme, le pré-miR va constituer un duplex transitoire miR:miR de 22 nucléotides, sous le contrôle de DICER, une autre ARNase. Le duplex est incorporé dans le complexe protéique RISC. Le brin mature du complexe est retenu et va réguler de façon négative son ARNm cible. Les miR régulent les ARNm selon deux mécanismes. En cas de complémentarité parfaite avec l'ARNm cible, l'ARNm est clivé par des ribonucléases en utilisant un complexe RISC similaire à celui de l'ARN interférence. Si la complémentarité est imparfaite avec l'ARNm, le miR se fixe au niveau de sa région 3'NT et réprime ainsi la traduction.

- Mode d'action des miR

L'action des miR représente le dernier niveau de régulation lié à l'épigénétique. Ces miR vont agir principalement de manière post traductionnelle. Les miR vont cibler la région 3'NT de l'ARNm cible et en cas de complémentarité parfaite avec l'ARNm cible, celui-ci est clivé par des ribonucléases en utilisant un complexe RISC similaire à celui de l'ARN interférence. Si la complémentarité est imparfaite avec l'ARNm, le miR réprime ainsi la traduction. L'inhibition de la traduction est le mode d'action principal des miR. Il existe différents mécanismes qui conduisent à l'inhibition de la traduction (Eulalio et al. 2008). Les miR peuvent bloquer l'élongation de la traduction ou provoquer la dissociation des ribosomes au niveau de l'ARNm (Figure 14A). Dans certains cas, les miR ne vont pas bloquer directement la traduction mais vont dégrader la chaîne polypeptidique naissante (Figure 14B). Les miR peuvent également agir au niveau des étapes précoces de la traduction, c'est à dire avant l'élongation. Dans ce cas, la protéine Argonaute (Ago) va entrer en compétition avec le facteur d'initiation eucaryote (eIF4E) lors de la liaison spécifique de cette protéine à la coiffe de l'ARNm. La protéine eIF4E fait partie du facteur multiprotéique eIF4F responsable de l'initiation de la traduction (Figure 14C). La protéine Ago peut également recruter la protéine eIF6, ce qui empêche la sous-unité ribosomique 60S d'adhérer à sous-unité 40S (Figure 14D). Dans les conditions normales de traduction, la coiffe se lie à la queue polyA par l'intermédiaire des protéines eIF4E et eIF4G et forme une boucle. Dans certains cas, la protéine Ago peut empêcher la formation de la boucle par un mécanisme encore mal compris, qui comprend la déadénylation (Figure 14E). Les miR peuvent également entraîner la dégradation de l'ARNm. En effet, les miR vont recruter des complexes protéiques qui vont permettre la déadénylation, l'enlèvement de la coiffe et qui favorisent la dégradation de l'ARNm-cible (Figure 14F).

Des travaux récents ont montré que les miR pouvaient réguler directement la transcription génique dans les cellules de mammifères notamment par la répression de l'expression du gène codant pour le facteur de transcription NFI-A (Nuclear Factor I/A) par le miR-223. NFI-A est connu pour être un répresseur de la granulopoïèse et une cible du miR-223. Après l'induction de la granulopoïèse par l'acide rétinoïque, le miR-223 se retrouve dans le noyau de la cellule où il se lie directement au promoteur de NFI-A. Cette liaison sert de guide pour le recrutement de complexes protéiques spécifiques, qui vont bloquer la transcription du gène. Ces complexes, appelés Polycomb, sont des répresseurs transcriptionnels capables de maintenir la chromatine

dans un état inactivé, *via* des modifications post-traductionnelles des histones. Dans ce cas, les marques répressives H3K27m3 augmentent, induisant la répression transcriptionnelle par inhibition de la liaison de l'ARN polymérase II au site d'initiation de la transcription (Zardo et al. 2012).

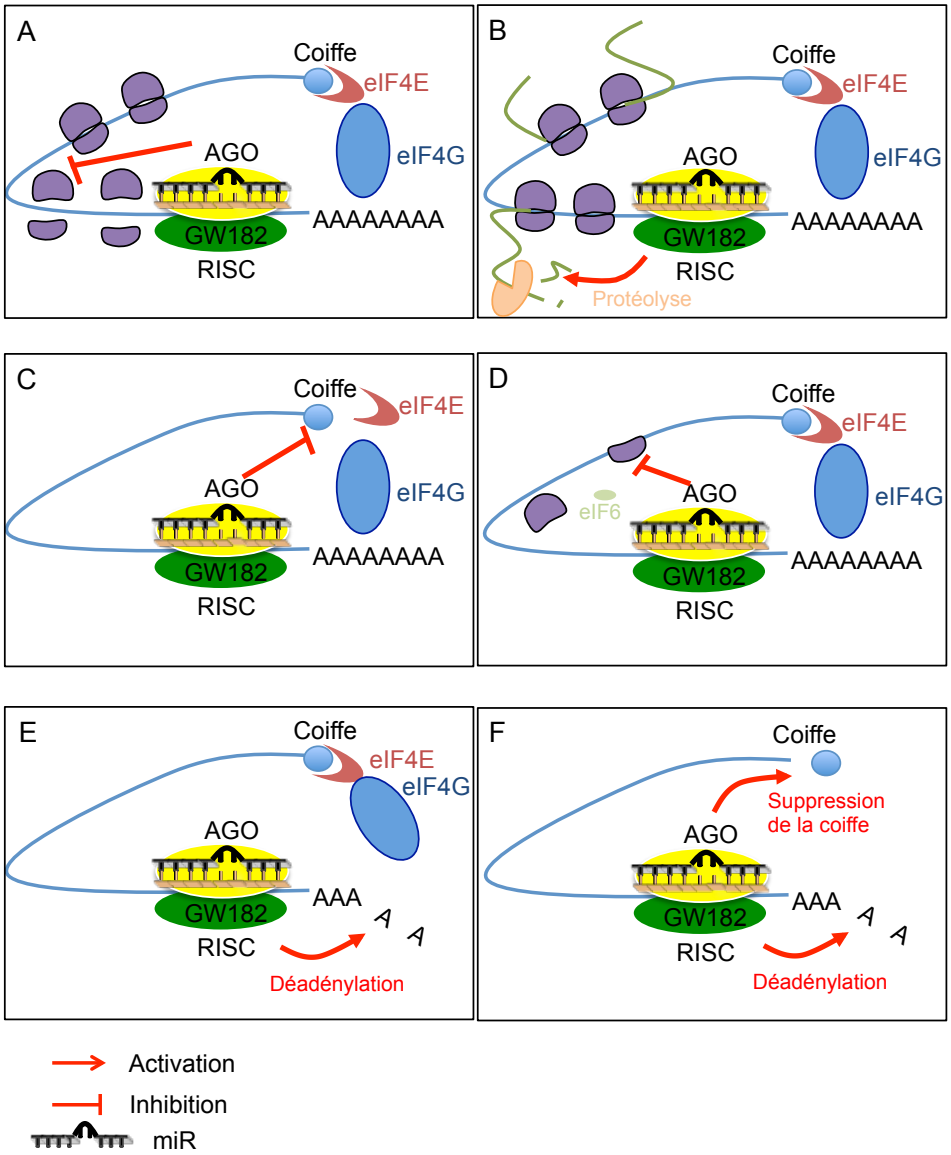


Figure 14 : Les différents modes d'action des miR au niveau de la traduction

A. La protéine Argonaute (Ago) agit sur les ribosomes pour inhiber la traduction de l'ARNm.

B. Les polypeptides en cours d'élongation sont protéolysés.

C. Inhibition de la liaison de la protéine eIF4E à la coiffe. Inhibition de la circularisation du transcrit nécessaire à la traduction.

D. La protéine Ago empêche la liaison des sous-unités ribosomales à l'ARNm.

E/F : Déadénylation et suppression de la coiffe empêchant la circularisation de l'ARN (Adapté de (Eulalio et al. 2008)).

Les miR et l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus complexe régulé par de nombreux mécanismes moléculaires incluant l'action des miR. L'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans l'engagement et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques est régulée par de nombreux miR. L'expression aberrante de miR peut entraîner des cancers hématologiques, comme les leucémies myéloïdes chroniques, les leucémies lymphoïdes chroniques, les myélomes multiples, et les lymphomes à cellules B (Undi et al. 2013).

Certains miR jouent un rôle crucial dans l'homéostasie érythroïde (Figure 15A). Les miR-144/451 sont fortement impliqués dans le contrôle du développement érythroïde. Ces miR ont pour cible l'ARNm de GATA-2 chez le « Zebrafish », conduisant à une diminution de l'expression de ce facteur de transcription. GATA-2 n'a pas encore été décrit comme une cible de ces miR chez les mammifères. Il est décrit dans la littérature, que le facteur de transcription GATA-1 régule l'expression des miR-144/451, en se liant à un élément de régulation situé en amont du promoteur du gène portant le cluster de miR-144/451. La liaison de GATA-1 au niveau de l'élément de régulation, active la transcription par l'ARN polymérase II, d'un seul ARN précurseur (pri-miR) codant pour les deux miR matures (Dore et al. 2008). Les travaux de Rasmussen et al. ont montré que la transcription du gène codant pour le cluster de miR-144/451 est strictement dépendante de la protéine Argonaute 2 (Ago2) et que ce cluster est requis pour l'homéostasie érythroïde. En absence d'Ago2 chez les souris Ago2$^{-/-}$, l'expression des miR-144 et 451 est complètement réprimée. Pour montrer l'importance du cluster au niveau du développement érythroïde, les auteurs ont utilisé des souris déficientes pour le cluster de miR-144/451 et ont observé une déficience au niveau de la maturation des érythroblastes provoquant des hyperplasies érythroïdes, des splénomégalies et des anémies légères (Rasmussen et al. 2010). Les miR-221/222 ciblent la région 3'NT de l'ARNm de c-kit, ce qui entraîne l'inhibition de l'érythropoïèse dans les cellules CD34^{+} et la diminution de la croissance des cellules érythroleucémiques TF-1 (Felli et al. 2005). Le facteur de transcription c-Myb et le miR-15a sont impliqués dans la transition entre les stades BFU-E et CFU-E. L'expression de c-Myb est élevée dans les cellules hématopoïétiques primitives et sa diminution est une condition essentielle pour la différenciation terminale. Il a été montré que le facteur de transcription c-Myb est capable d'activer la transcription du miR-15a. De plus, le miR-15a cible la région 3'NT de l'ARNm de c-Myb, bloquant

les cellules en phase G1 du cycle cellulaire. Il existe donc une boucle de régulation (rétrocontrôle) entre c-Myb et le miR-15a dans les cellules hématopoïétiques (Zhao et al. 2009). Lors du développement embryonnaire, l'hémoglobine fœtale ($\alpha2\gamma2$) est la protéine porteuse d'oxygène essentielle au 2ème et 3ème trimestre. Cette protéine va progressivement diminuer pour laisser place à l'hémoglobine adulte ($\alpha2\beta2$). Des travaux ont montré que le miR-96 inhibe l'expression de la γ-globine conduisant à la répression de l'érythropoïèse (Azzouzi et al. 2011). Dans le cas de trisomie 13, l'expression du gène de la γ-globine est régulée de façon anormale (régulation positive) par le cluster de miR-15a/16-1. Le segment du chromosome 13 contient les gènes des miR-15 et miR-16. La surexpression de ces miR, conduit à une régulation négative de leur gène cible c-Myb, entrainant une expression élevée de l'hémoglobine fœtale (Sankaran et al. 2011).

Concernant la voie mégacaryocytaire (MK), les miR sont impliqués dans le contrôle du développement des mégacaryocytes et dans la libération des plaquettes. Au niveau de cette voie, il existe un véritable micro-réseau de régulation entre les miR et les facteurs de transcription (Figure 15B). Ainsi, le miR-155 est très exprimé dans les progéniteurs hématopoïétiques $CD34^+$ alors qu'il diminue fortement au cours de la différenciation MK. Des études fonctionnelles ont montré que l'expression forcée du miR-155 altère la prolifération et la différenciation des cellules MK. Cette surexpression provoque une diminution de l'expression des facteurs de transcription Ets-1 et Meis qui sont des cibles de ce miR, avec des fonctions bien connues dans les cellules MK. En conclusion la diminution de ce miR et donc l'expression des facteurs Ets-1 et Meis-1 sont nécessaires pour la prolifération et la différenciation des progéniteurs MK (Romania et al. 2008). Le miR-34a contribue à la différenciation MK en ciblant c-Myb et les kinases cyclines dépendantes (CDK), réprimant ainsi la prolifération tout en favorisant la différenciation des cellules (Navarro et al. 2009). Le miR-150 favorise la différenciation des progéniteurs PME plutôt vers la voie MK que vers la voie érythroïde. La TPO induit le miR-150 qui va lui même cibler c-Myb. Il a été montré que dans les tumeurs plaquettaires myéloprolifératives, le miR-28a est surexprimé, ce qui bloque la différenciation MK des cellules $CD34^+$ en ciblant le récepteur à la TPO (Girardot et al. 2010). Le facteur de transcription RUNX1 est capable d'activer la transcription du miR-27a qui va lui même cibler l'ARNm de

RUNX1, diminuant ainsi son expression (Ben-Ami et al. 2009). D'autres miR comme le miR-126, miR-10a/10b, miR-17, miR-130a, miR-20, miR-146a sont impliqués dans la différenciation MK. Concernant les miR-109, miR-126, miR-20 et miR-155, leur expression est inhibée lors de la différenciation MK (Undi et al. 2013).

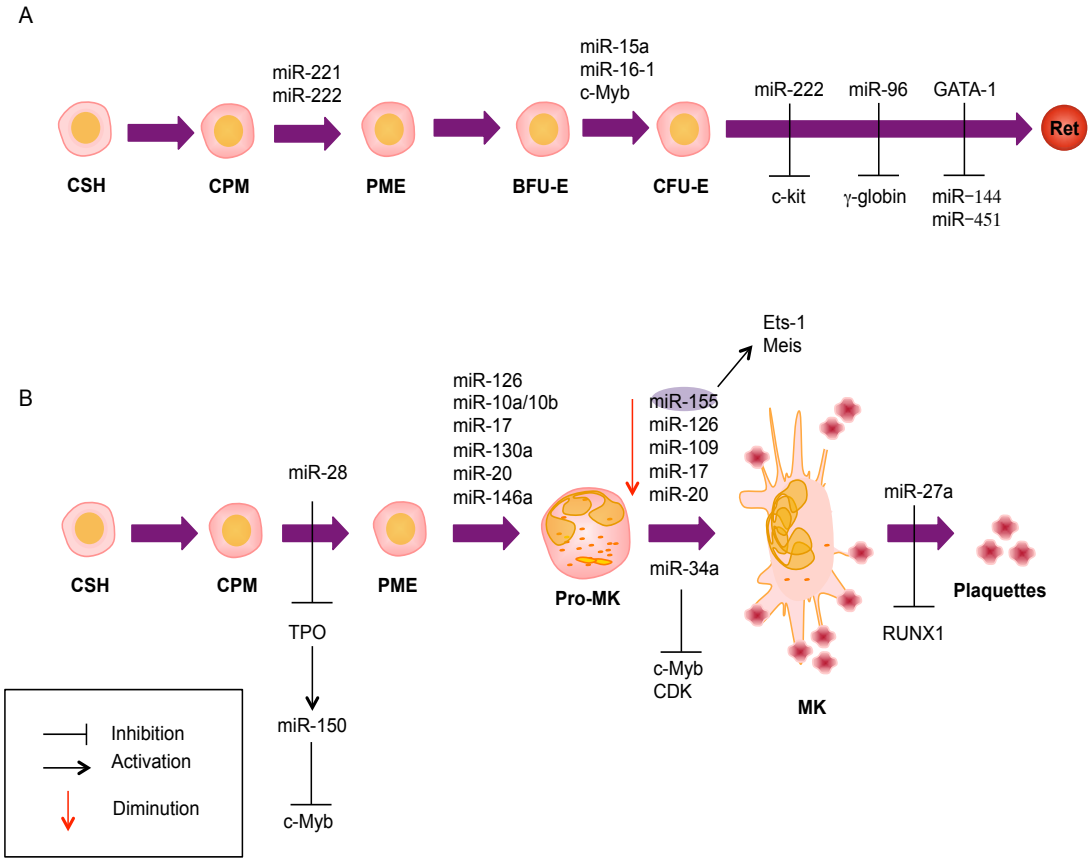


Figure 15 : Les principaux miR et facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse et de la mégacaryopoïèse.

L'érythropoïèse (A) et la mégacaryopoïèse (B) sont contrôlées par un micro-réseau de régulation entre les miR et les facteurs de transcription. Les miR régulent l'expression de facteurs érythroïdes et mégacaryocytaires et les facteurs de transcription régulent l'expression des miR impliqués dans ces voies. CSH : Cellule souche hématopoïétique ; CPM : Cellule Progénitrice Myéloïde ; PME : Progéniteur Erythro-Mégacaryocyte ; BFU-E : Burst forming unit erythroid ; CFU-E : colony forming unit erythroid ; Ret : Réticulocytes ; Pro-MK : Promégacaryoblastes ; MK : Mégacaryoblastes.

1.3 La régulation épigénétique de l'expression des gènes par les HDAC

1.3.1 L'acétylation des histones

1.3.1.1 La chromatine

La transcription des gènes dans les cellules eucaryotes est régulée par la structure de l'ADN qui permet ou non l'accessibilité des facteurs de transcription au niveau des promoteurs des gènes. En effet, l'ADN se trouve compacté dans le noyau sous forme de chromatine, qui est la structure de base des chromosomes eucaryotes. La chromatine correspond à un complexe très organisé et dynamique d'ADN et de protéines histones et non histones (Figure 16). La sous-unité fondamentale de la chromatine est le nucléosome, qui représente le premier niveau de compaction de l'ADN (Kornberg et al. 1999). Les nucléosomes sont des structures composées par 146 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones (deux copies de chaque histone: H2A, H2B, H3 et H4). Ces histones constituent la « particule de cœur » du nucléosome. L'histone H1 est une histone de liaison de l'ADN à la particule de cœur qui permet de sceller le nucléosome. La succession de nucléosomes forme la fibre chromatinienne de 11 nm de diamètre et cette fibre peut elle même adopter des niveaux d'organisation plus compacts. L'architecture locale de la chromatine est donc un facteur important impliqué dans la régulation de l'expression des gènes. La forme condensée de la chromatine (hétérochromatine) est inactive en terme de transcription alors que la forme décondensée (euchromatine) correspond à une forme active. Lors de l'activation de la transcription des gènes, l'ADN qui est normalement inaccessible aux protéines et au complexe d'activation de la transcription, devient accessible grâce à la modification des histones. La partie N-terminale des histones, qui est non structurée et qui sort du nucléosome, possède de nombreux résidus susceptibles de subir des modifications post-traductionnelles spécifiques (Figure 17). En effet, cette queue d'histones (histone tail) peut subir des méthylations (Zhang et al. 2001), des acétylations (Sterner et al. 2000), des phosphorylations (Nowak et al. 2004) mais aussi des propionylations et butyrylations (Chen et al. 2007), des ubiquitinations (Sun et al. 2002; Osley 2004), des sumoylations (Nathan et al. 2003), des ADP ribosylations (Golderer et al. 1991), des

glycosylations (Liebich et al. 1993; Gugliucci 1994), des biotinylations (Stanley et al. 2001; Rodriguez-Melendez et al. 2003) et des carbonylations (Wondrak et al. 2000).

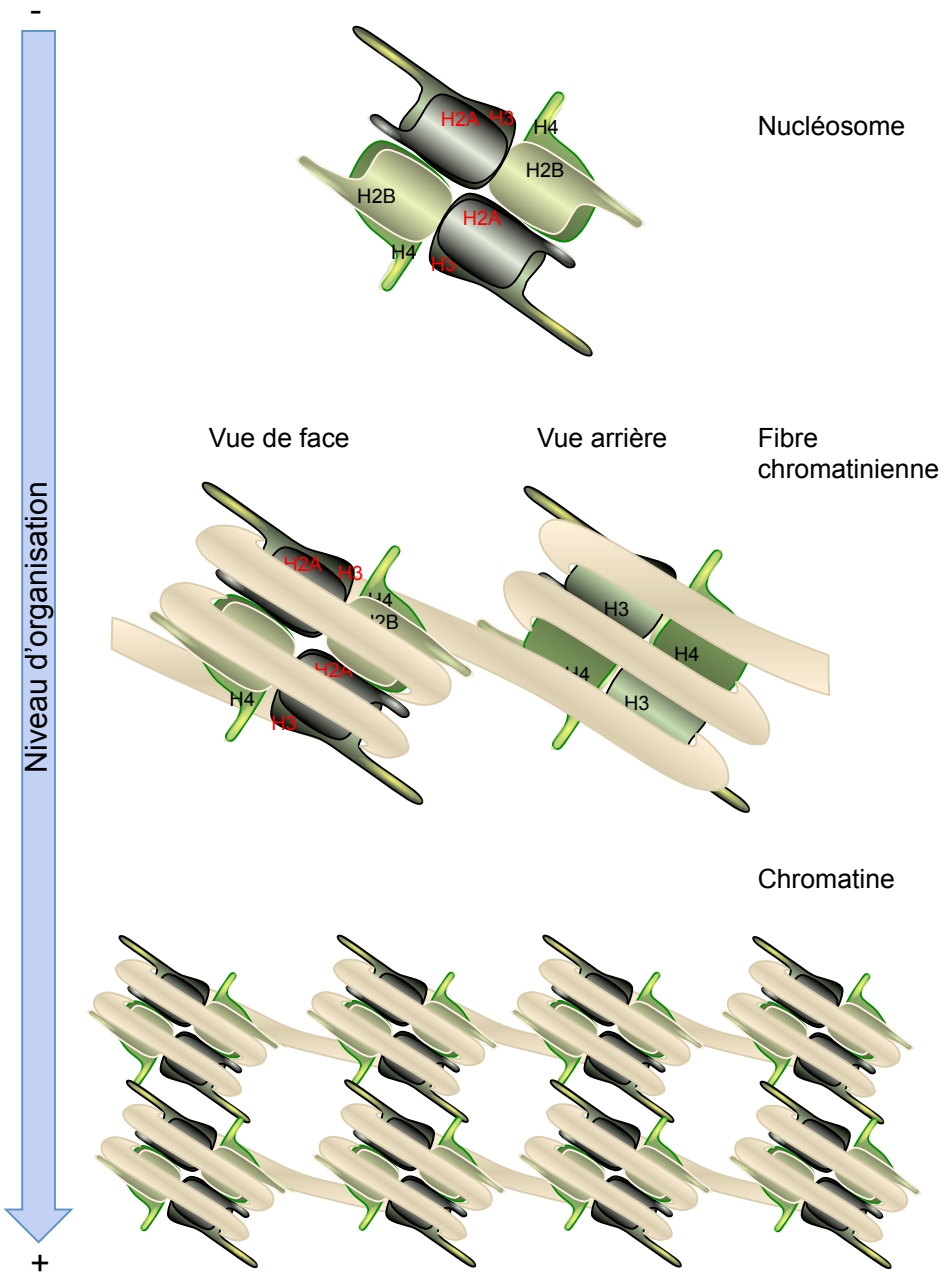


Figure 16 : Les différents niveaux d'organisation de la chromatine

Le nucléosome est l'unité fondamentale de la chromatine. Il est composé d'un octamère d'histones formé de deux histones H2A, H2B, H3 et H4. L'ADN vient s'enrouler autour de cette structure. L'enchaînement de plusieurs nucléosomes forme la fibre chromatinienne de 11 nm de diamètre. Cette fibre va ensuite former des niveaux d'organisation plus compacts pour former la chromatine.

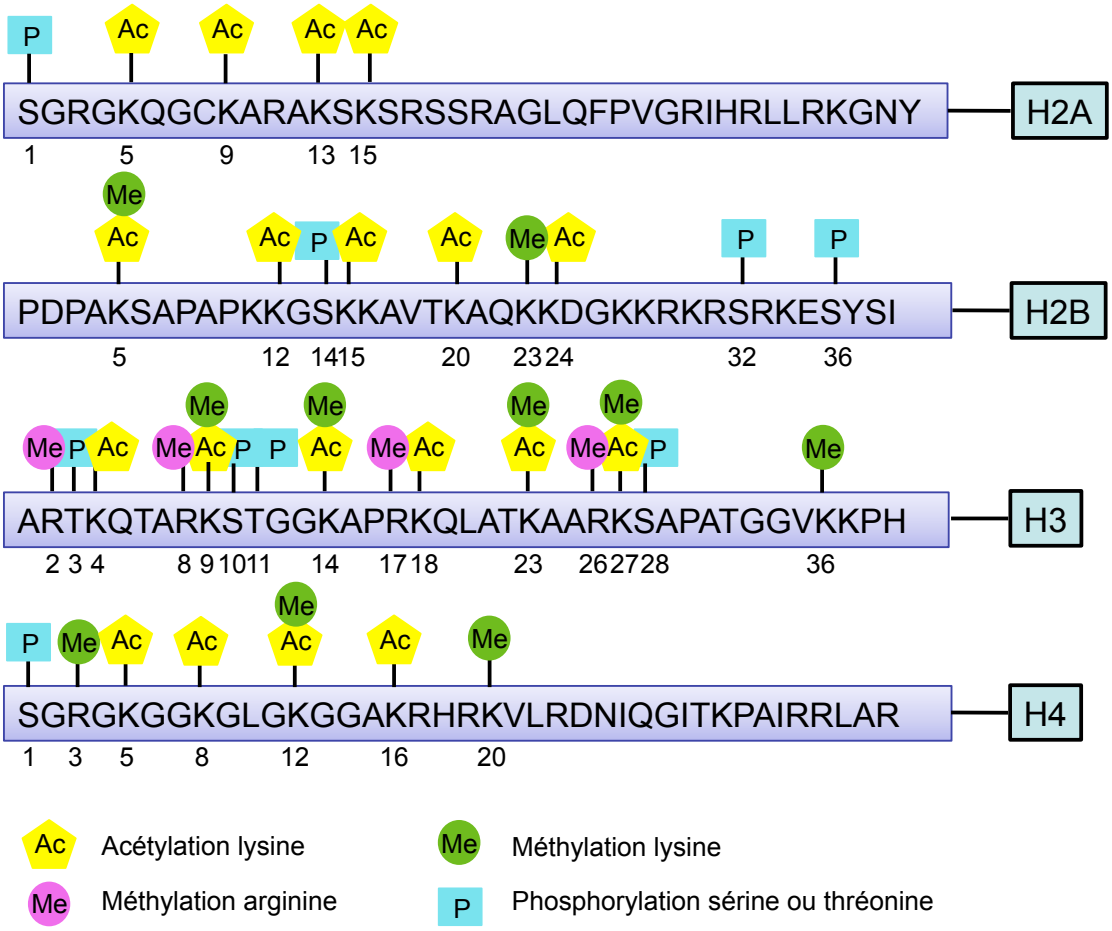


Figure 17 : Principales modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications majeures de la queue N-terminale des histones H2A, H2B, H3 et H4 se font au niveau de certains résidus, à des positions spécifiques indiquées par un chiffre en dessous de la séquence (Adapté de (Folmer et al. 2010))

1.3.1.2 Les modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications post-traductionnelles des histones sont générées par différentes enzymes spécifiques qui peuvent agir seules, de façon séquentielle ou en combinaison. Ces modifications représentent le « code des histones » qui est impliqué dans la régulation de l'expression des gènes (Margueron et al. 2005). Dans les années 1960, Allfrey et al. ont proposé que l'acétylation des histones pourrait avoir un rôle central dans la régulation de la structure et la fonction de la chromatine (Allfrey et al. 1964). Aujourd'hui, il existe de nombreuses preuves que l'acétylation des résidus lysine des histones (Hong et al. 1993) et des protéines non histoniques (Bergel et al. 2000), peut moduler la structure locale de la chromatine et en particulier, modifier les interactions ADN/histones, histone/histones et histones/protéines non histoniques. D'une façon générale, l'acétylation catalysée par les histones acétyl transférases (HAT), est corrélée à l'activation transcriptionnelle et donc à l'expression des gènes, alors que la désacétylation, résultant de l'activité enzymatique des histones désacétylases (HDAC), est associée à la répression de la transcription et donc à l'inhibition de l'expression des gènes (Grunstein 1997; Wade et al. 1997; Peterson 2002) (Figure 18). L'acétylation des résidus lysine entraîne une neutralisation des charges positives de la queue N-terminale des histones, ce qui affaiblit l'interaction électrostatique entre histones et ADN. La chromatine peut alors se décondenser, permettant l'exposition de nombreux sites *cis*-régulateurs des gènes à l'ARN polymérase II et aux protéines de régulation de la transcription (Grunstein 1997). D'autres études ont décrit un modèle alternatif, où la queue des histones pourrait elle-même participer directement à la liaison des facteurs de transcription, qui reconnaitraient les acides aminés modifiés (Vettese-Dadey et al. 1996; Vitolo et al. 2000; Margueron et al. 2005). Les deux classes d'enzymes, HAT et HDAC, possèdent donc des activités opposées permettant de maintenir un équilibre au niveau de l'acétylation des résidus lysine des histones situées dans les nucléosomes.

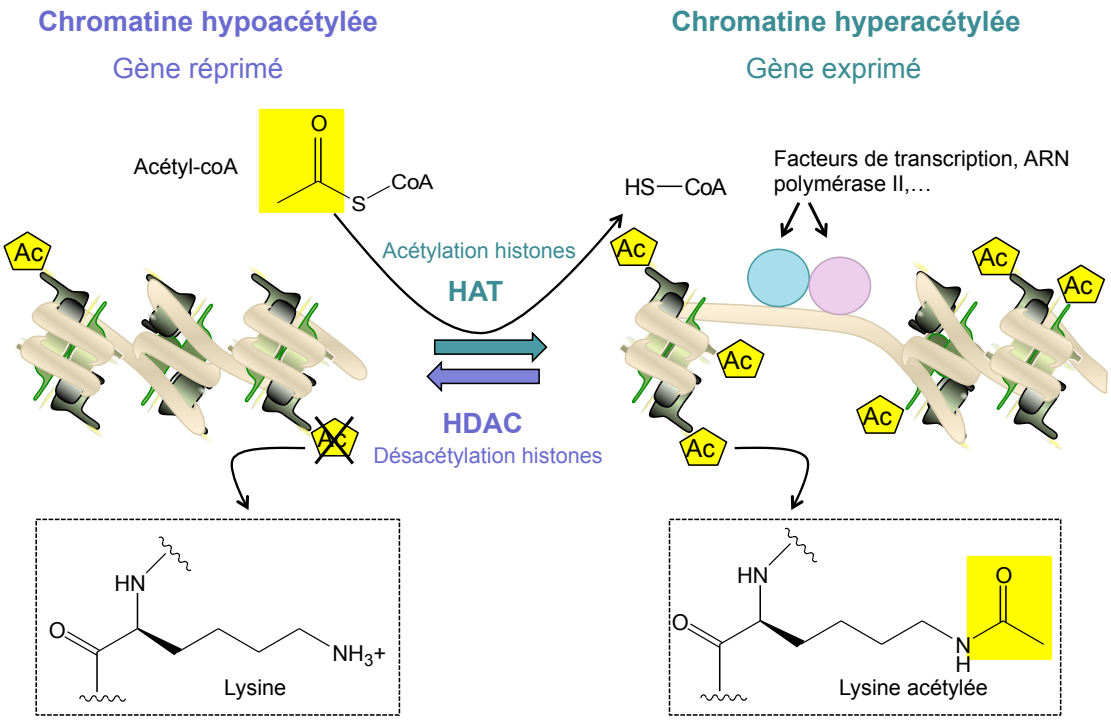


Figure 18 : Rôle des HAT et des HDAC sur l'activation de la transcription

L'acétylation des résidus lysines sur la chaîne N-terminale des histones est catalysée par les histones acétyl transférases (HAT). La réaction inverse est catalysée par les histones désacétylases (HDAC). L'action des HAT entraîne la décondensation de la chromatine, ce qui permet aux différents facteurs de transcription, à l'ARN polymérase II et aux autres éléments qui sont requis pour la transcription, de se lier à l'ADN et ainsi d'initier la transcription des gènes. L'enzyme HAT catalyse la réaction de transfert du groupement acétyl non chargé provenant de l'acétyl Coenzyme A (Acétyl-CoA) sur le groupement ammonium ($-NH3^{+}$) de la lysine (Adapté de (Folmer et al. 2010)).

Les histones acétyl transférases (HAT)

Plusieurs familles de HAT ont été identifiées. Les plus étudiées sont les Gcn5-related N-acetyltransferase (GNAT)/p300/CBP associated factor (PCAF), p300/CREB-binding protein (CBP) et MYST (pour les membres fondateurs MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 et Tip60). Ces différentes familles vont agir spécifiquement sur certaines histones et protéines non histones (Inche et al. 2006).

Les histones désacétylases (HDAC)

Dix-huit HDAC ont été identifiées incluant sept sirtuines. Chez l'Homme, les HDAC sont divisées en quatre classes basées sur leur homologie avec les histones désacétylases chez la levure (Gregoretti et al. 2004). Les classes I, II et IV sont des métallo-enzymes dépendantes du zinc, alors que la classe III ou sirtuines sont des désacétylases dépendantes de la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) (Grozinger et al. 2002) (Tableau 1).

Les enzymes de classe I regroupent les HDAC 1, 2, 3 et 8. Ce sont des protéines de 350 à 500 acides aminés, exprimées dans la plupart des types cellulaires et localisées dans le noyau (de Ruijter et al. 2003) à l'exception de la HDAC 3 qui peut aussi être localisée dans le cytoplasme.

Les enzymes de classe II sont divisées en deux sous-classes : la sous-classe IIa regroupant HDAC 4, 5, 7 et 9 et la sous-classe IIb formée des HDAC 6 et 10. Ces enzymes sont composées d'environ 1000 acides aminés. Leur domaine catalytique contient plusieurs motifs conservés qui sont différents des enzymes de classe I (de Ruijter et al. 2003) et les HDAC 6 et 10 contiennent un deuxième site catalytique. Les HDAC de classe II sont capables de naviguer entre le noyau et le cytoplasme. Dans le cytoplasme, cette classe d'enzyme désacétyle les protéines non histones.

Les enzymes de classe III regroupent les sirtuines et la classe IV, la HDAC 11.

Tableau 1: Les différentes histones désacétylases (HDAC) exprimées chez l'Humain

Les différentes classes d'HDAC sont déterminées selon leurs homologies de séquence avec les histones désacétylases chez la levure. Comme présenté dans ce tableau, les HDAC possèdent un ou plusieurs domaines catalytiques, un mécanisme d'action Zn^{2+} ou NAD^{+} dépendant et ont une localisation cytoplasmique ou nucléaire

Classe	Enzyme	Domaine catalytique	Mecanisme	Localisation cellulaire
I	HDAC 1 HDAC 2 HDAC 3 HDAC 8	1 1 1 1	Zn^{2+} dépendant Zn^{2+} dépendant Zn^{2+} dépendant Zn^{2+} dépendant	Noyau Noyau Noyau/cytoplasme Noyau
IIa	HDAC 4 HDAC 5 HDAC 7 HDAC 9	1 1 1 1	Zn^{2+} dépendant Zn^{2+} dépendant Zn^{2+} dépendant Zn^{2+} dépendant	Noyau/cytoplasme Noyau/cytoplasme Noyau/cytoplasme Noyau
IIb	HDAC 6 HDAC 10	2 2	Zn^{2+} dépendant Zn^{2+} dépendant	Noyau/cytoplasme Noyau/cytoplasme
III	Sirtuine 1-7	1	NAD^{+} dépendant	Noyau/cytoplasme
IV	HDAC 11	1	Zn^{2+} dépendant	Noyau

1.3.1.3 Implication des histones désacétylases dans la regulation l'hématopoïèse

Les HDAC de Classe I sont globalement impliquées dans la croissance et la différenciation cellulaires chez les mammifères par la modification des structures de la chromatine et l'expression des gènes (Lagger et al. 2002; Yang et al. 2008). Cependant, relativement peu de choses sont connues sur leurs rôles spécifiques dans l'hématopoïèse normale. Une étude récente sur l'expression et la fonction des HDAC de classe I dans les cellules hématopoïétiques humaines, a montré que l'expression de ces HDAC est très faible dans les cellules $CD34^+$ et que HDAC1 joue un rôle dans la spécification de la lignée au cours de l'hématopoïèse. De plus, HDAC1 est surexprimée dans les cellules de leucémie myéloïde aiguë (AML) et contribue à la leucémogenèse en perturbant la différenciation myéloïde (Wada et al. 2009). Les HDAC ne sont donc pas seulement des facteurs auxiliaires de la régulation épigénétique, mais elles jouent un rôle direct dans la détermination du destin cellulaire des progéniteurs hématopoïétiques.

L'expression de HDAC1 est augmentée au cours de la différenciation des différentes cellules progénitrices avec une baisse de l'expression des facteurs GATA-2 et MZF-1, qui sont abondamment exprimés dans les cellules progénitrices précoces (Nagai et al. 1994; Gaboli et al. 2001). Les progéniteurs myéloïdes communs s'engagent vers la voie érythro-mégacaryocytaire lorsque l'expression de HDAC1 est activée par GATA-1. En revanche, ils se différencient en cellules myéloïdes, en particulier en granulocytes, quand HDAC1 est inhibée par C/EBP (Wada et al. 2009). Yamamura et al., ont montré que l'inhibition pharmacologique de l'activité des HDAC améliore la production des précurseurs engagés induite par L'IL3 et le SCF à partir de cellules $CD34^+$ du sang périphérique humain et inhibe la différenciation érythroïde induite par l'Epo de ces précurseurs (Yamamura et al. 2006). Des données antérieures avaient révélé que les HDAC ont diverses fonctions dans l'érythropoïèse humaine adulte. En effet, les HDAC régulent de façon négative la croissance des précurseurs érythroïdes précoces induite par l'IL3, en supprimant leur réactivité à cette cytokine. De plus, elles jouent un rôle important dans la différenciation induite par l'Epo et la survie des précurseurs érythroïdes (Fujieda et al. 2005; Yamamura et al. 2006).

Des travaux plus récents ont montré que HDAC5 fait partie du complexe « nuclear remodeling shuttle erythroid » (NuRSERY) avec les protéines GATA-1, EKLF, pERK, présent dans les cellules érythroïdes humaines. Ce complexe est capable de réguler l'expression des gènes de globines (Varricchio et al. 2014).

1.3.1.4 Autres rôles des HAT et des HDAC

Outre leur rôle dans la régulation de l'expression des gènes, les HAT et les HDAC jouent aussi un rôle important au niveau des interactions protéines/protéines, de la liaison à l'ADN, de la stabilité des protéines ou de la localisation cellulaire qui sont impliqués dans de nombreux processus biologiques dans la cellule. Une activité aberrante des HAT ou des HDAC entrainant un déséquilibre entre l'acétylation et la désacétylation peut favoriser l'apparition d'un cancer, de maladies neurologiques (Parkinson, Alzheimer, épilepsie, …), de maladies infectieuses (la malaria, la toxoplasmose, le sida, …), et de maladies inflammatoires (l'arthrite rhumatoïde). De plus, une dérégulation du couple HAT/HDAC peut être impliquée dans les désordres cardiovasculaires et les pathologies liées à l'âge (Folmer et al. 2010). Dans les cellules tumorales, une activité anormalement élevée des HDAC peut empêcher la transcription de gènes-clés régulant d'importantes fonctions, comme la prolifération cellulaire, la différenciation, la régulation du cycle cellulaire ou l'apoptose (Ropero et al. 2007). Ainsi, les HDAC constituent une cible thérapeutique potentielle pour le traitement des cancers, et de nombreux inhibiteurs d'HDAC ont été développés au cours de la dernière décennie.

1.3.2 Les inhibiteurs d'HDAC

Les inhibiteurs d'HDAC (HDACi) peuvent induire l'expression de gènes conduisant à la différenciation, à l'arrêt du cycle cellulaire, à l'apoptose des cellules tumorales, à l'angiogenèse et à l'activation de certaines voies de signalisation qui modulent la croissance cellulaire, la différenciation ou l'apoptose (Hrabeta et al. 2013). Ces inhibiteurs possèdent des structures diverses qui agissent généralement en bloquant l'accès au site actif des HDAC, de façon réversible ou non.

Ces molécules inhibitrices sont classées en quatre groupes selon leur structure chimique : Les acides hydroxamiques, les molécules à courtes chaînes d'acide gras, les tétrapeptides cycliques et les benzamides.

Parmi les acides hydroxamiques les mieux décrits, la TSA (Trichostatine A) et le SAHA (suberoylanilide acide hydroxamique) sont des pan-inhibiteurs des HDAC. A l'origine, la TSA était utilisée comme agent antifongique, puis la propriété antiproliférative de cette molécule sur les cellules cancéreuses a été mise en évidence. La capacité de la TSA à inhiber les HDAC a été découverte en 1990 (Yoshida et al. 1990) et cette molécule est efficace à des concentrations de l'ordre du nanomolaire *in vitro*. En 2006, le SAHA également connu sous le nom de Vorinostat, devient le premier pan-inhibiteur des HDAC approuvé par l'autorité américaine en matière de sécurité alimentaire et sanitaire, la « Food and Drug Administration » (FDA) (Riester et al. 2007). Ces deux inhibiteurs des HDAC ont une longue chaine aliphatique qui peut entrer facilement dans la poche tubulaire de l'enzyme, où est localisé le site actif. Le groupe acide hydroxamique situé à l'extrémité de la chaîne aliphatique, chélate l'ion zinc (Zn^{2+}) au fond de la poche de l'enzyme pour inactiver. De l'autre côté, la chaîne bloque l'entrée du substrat dans la poche (Finnin et al. 1999).

La classe des tétrapeptides cycliques regroupe des composés présentant un haut potentiel d'inhibition des HDAC. La plupart de ces composés sont des produits naturels comme l'apicidine (champignon) ou la Romidepsine (un depsipeptide bactérien).

Dans la classe des benzamides, le N-acétyldinaline (CI-994) et le MS-275 sont en phase d'essai clinique. Le MS-275 cible spécifiquement les HDAC de classe I (1, 2, 3 et 9) et est actuellement en phase II d'essais cliniques, sur les mélanomes métastasiques (Seidel et al. 2012).

Parmi les HDACi de la classe des acides gras à courte chaîne, les plus représentatifs sont l'acide butyrique, le phényl butyrate et l'acide valproïque (VPA). Comme le VPA, l'acide butyrique est capable d'inhiber les HDAC de classe I et IIa. Il a été suggéré que la sélectivité de l'acide butyrique et du VPA, concernant l'inhibition des classes d'HDAC I et IIa, résulterait de l'absence de groupements aromatiques dans la structure de ces 2 molécules. En effet, ces groupements aromatiques qui forment la coiffe des inhibiteurs d'HDAC, sont nécessaires pour bloquer l'entrée du substrat dans le site actif de l'enzyme. L'acide butyrique et le VPA qui ne possèdent pas de coiffe, ne sont pas tolérés dans la région hydrophobe du site actif des enzymes de classe IIb (Bieliauskas et al. 2008). De plus, le fait que ces deux composés aient une courte chaîne aliphatique limite leur sélectivité.

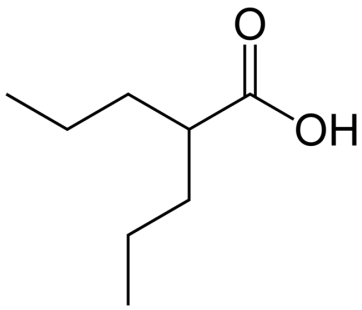
1.4 L'acide valproïque

1.4.1 Un agent anti-convulsant

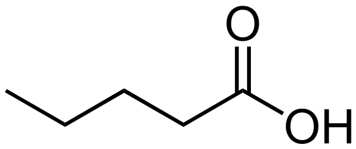
L'acide valproïque (VPA), également appelé acide 2-propylpentanoïque ($C_8H_{16}O_2$) ou acide n-dipropylacetique (Figure 19A), est un acide gras ramifié à courtes chaînes qui dérive de l'acide valérique (Figure 19B) isolé des rhizomes de la valériane (*Valeriana officinalis)* de la famille des Valérianacées (Figure 19C). Cette molécule a été synthétisée pour la première fois en 1882 par Burton (Burton 1882). Pendant près d'un siècle, cette molécule a été utilisée comme un solvant « physiologiquement inerte » pour les composés organiques. C'est en 1963, lors d'une étude axée sur les molécules à fort potentiel d'activité anticonvulsive, que le VPA a été identifié comme un agent capable de prévenir les convulsions induites par le pentylène tétrazol chez les rongeurs (Meunier et al. 1963; Lebreton et al. 1964; Lebreton et al. 1964). En solution, cette molécule forme un liquide clair à température ambiante et sa demie-vie *in vivo* est de 9 à 16h.

Le VPA modifie l'activité de l'acide γ-amino butyrique (GABA), qui est le neurotransmetteur inhibiteur principal dans le système nerveux central, présent chez les mammifères et les oiseaux. Ce neuro-modulateur joue un rôle important chez l'adulte en empêchant une excitation prolongée des neurones, mais il peut également avoir un rôle neurotrophique, en favorisant la croissance de certains neurones. Les effets inhibiteurs du GABA servent en fait à contrebalancer les effets excitateurs du glutamate. Un déséquilibre entre ces deux neuromédiateurs est responsable de l'épilepsie ou de l'ischémie cérébrale. Le VPA est capable d'inhiber la dégradation du GABA en bloquant l'enzyme GABA transaminase (GABA-T), conduisant à l'augmentation de sa concentration (Mesdjian et al. 1982). De plus, le VPA est aussi capable d'atténuer l'excitation induite par le N-méthyl-D-aspartate (Zeise et al. 1991; Gean et al. 1994), de bloquer les canaux Na^+, Ca^{2+} et K^+ dépendants du voltage (VanDongen et al. 1986) qui contrôlent l'excitabilité intrinsèque du système nerveux. Le blocage de ces canaux par le VPA permet d'atténuer la dépolymérisation de la membrane plasmique, qui entraîne la libération anormale du neurotransmetteur responsable des crises d'épilepsie.

A



B



C

Figure 19 : A. Formule développée de l'acide valproïque, B. Formule développée de l'acide valérique, C. Valériane officinale

Photo de J.F. Gaffard, Bucy-lès-Gy, juin 2004
http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Valeriana+officinalis

Outre son utilisation en clinique comme médicament anticonvulsant et contre les troubles bipolaires (McElroy et al. 1989), le VPA présente des effets bénéfiques sur la dépression clinique (Calabrese et al. 1989), les crises d'absence (Erenberg et al. 1982; Coppola et al. 2004), les crises tonico-cloniques, les crises partielles complexes (Dean et al. 1988), l'épilepsie myoclonique juvénile (Calleja et al. 2001), les convulsions associées au syndrome de Lennox-Gastaut, également connu sous le nom de syndrome de Lennox (Friis 1998), les migraines et la schizophrénie. Le VPA est commercialisé sous le nom de Dépakote (France), Depakine (Belgique, France, Suisse), Dépakine (France), Merck-valproate (Belgique), Micropakine lp (France), Orfiril (Suisse) et Convulex (Belgique et Suisse).

1.4.2 Un modulateur épigénétique

Le VPA, inhibiteur des histones désacétylases

Au-delà de ses propriétés cliniques en neurologie, le VPA a été plus récemment décrit comme un inhibiteur des histones désacétylases (HDAC), faisant de cette molécule un agent anti-cancéreux potentiel (Gurvich et al. 2004). Le VPA est capable de modifier l'expression de nombreux gènes jouant un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation, la réparation de l'ADN et l'apoptose (Rosato et al. 2003; Martirosyan et al. 2006; Savickiene et al. 2006; Chen et al. 2009).

Le VPA cible principalement les HDAC de la classe I (IC50 de l'ordre de 0,7 à 1 mM) (Gottlicher 2004) mais il peut aussi inhiber les HDAC de la classe II (IC50 de l'ordre de 1 à 1,5 mM), excepté les HDAC 6 et 10 (Gurvich et al. 2004). Il est intéressant de mentionner que les HDAC de classes I et II ont été décrites comme étant fortement impliquées dans la fonction neuronale, ce qui pourrait expliquer, en plus de l'effet sur le GABA, l'action du VPA dans les pathologies neuronales.

Par ailleurs, étant donné que l'équilibre entre l'acétylation et la désacétylation, contrôlé par les enzymes HAT et HDAC, n'est pas limité aux histones (Minucci et al. 2006), le VPA pourrait comme d'autres HDACi, moduler l'activité d'autres types de protéines comme des facteurs de transcription, des protéines chaperonnes ou des suppresseurs de tumeur comme STAT-3, Ku70 (permettant la libération de Bax), HSP90 et p53 (Choudhary et al. 2009). Pour toutes les voies de signalisation

modulées, il n'est pas encore bien établi comment le VPA peut réguler des mécanismes épigénétiques y compris l'inhibition de l'acétylation de molécules autres que les histones, respectivement par d'autres mécanismes moléculaires.
Il est connu que l'acide valproïque peut cibler une large gamme de pathologies. En effet, actuellement le VPA semble être un bon candidat pour la thérapie des maladies neurologiques, comme la maladie de Parkinson, l'atrophie musculaire spinale ou la maladie de Huntington. Ce composé joue également un rôle au niveau de HDAC1 qui est impliquée dans la maintenance du virus VIH dans les cellules infectées et dans l'hématopoïèse. D'autres études ont montré que le VPA pourrait être utilisé dans le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne (Chateauvieux et al. 2010).

Le VPA favorise la déméthylation de l'ADN

Il est connu que la méthylation des îlots CpG de séquences régulatrices de l'ADN, contribue à la régulation de l'expression génique. Une hyperméthylation du promoteur, correspond généralement à une inhibition de l'expression des gènes, et cette hyperméthylation est contrôlée par l'ADN méthyltransferase (DNMT). L'existence d'ADN déméthylase a été démontrée il y a une décennie, ce qui conduit à une forme d'ADN déméthylée active (Bhattacharya et al. 1999; Ramchandani et al. 1999). Les HDACi ont été associés à la déméthylation de l'ADN et à la forme active déméthylée. Le mécanisme exact n'est pas encore connu, mais le VPA pourrait favoriser indirectement l'activité enzymatique des ADN déméthylases. Il a été montré que le VPA empêche la méthylation de l'ADN grâce à son activité HDACi, puisque l'inhibition de l'enzyme HAT diminue l'effet de déméthylation produit par le VPA (Cervoni et al. 2001; Cervoni et al. 2002).
Le VPA est également capable d'induire des mono-, di-ou tri-méthylations au niveau des histones H3, notamment sur la lysine 4 (H3K4) (Bradbury et al. 2005; Harikrishnan et al. 2008; Kaushansky 2008; Lunke et al. 2009).

1.4.3 L'acide valproïque comme anticancéreux

Parmi les nombreux médicaments qui présentent un intérêt dans le domaine de la « thérapie moléculaire », ceux qui ont une action sur les mécanismes épigénétiques sont encourageants, car ils sont capables de cibler la chromatine *via* les protéines

associées (HDAC, DNMT, HP1 and SMC). Ainsi, les médicaments épigénétiques affectent l'expression de nombreuses protéines et peuvent donc cibler un large panel de pathologies, en particulier les cancers, en activant l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs réprimés (Vigushin et al. 2002).

Le VPA est actuellement en essai clinique pour le traitement des maladies neurologiques, des cancers et d'accoutumances ou en tant que complément aux agents antiviraux.

Le VPA présente un effet anti-tumoral puissant sur une grande variété de cancers lors des études précliniques *in vitro* et *in vivo*, grâce à la modulation de multiples voies incluant l'arrêt du cycle cellulaire, l'angiogenèse, l'apoptose, la différenciation et la sénescence. Ces effets semblent être spécifiques du type cellulaire et peuvent dépendre du degré de différenciation et, dans le cas du cancer, du degré d'altération (Duenas-Gonzalez et al. 2008). La majorité des études précliniques concernant les effets anti-tumoraux du VPA ont été effectuées sur des leucémies myéloïdes ou lymphoïdes. Cependant, pour les tumeurs solides, les études pré-cliniques ont donné des résultats plutôt intéressants. Par exemple, dans le cancer de la prostate, le VPA induit l'apoptose dans des lignées cellulaires androgéno-dépendantes et indépendantes et une inhibition de croissance dans des modèles de xénogreffes (Thelen et al. 2004; Xia et al. 2006). Concernant le cancer du côlon, le VPA induit l'apoptose de façon significative dans certaines lignées cellulaires qui expriment la protéine APC (polypose colique adénomateuse) et dans les cellules du cancer du côlon primaire (Friedmann et al. 2006). Dans le cas du cancer du sein, le VPA inhibe la croissance de lignées cellulaires indépendantes des récepteurs aux estrogènes (Olsen et al. 2004), potentialise l'action du Tamoxifène, du Raloxifène, du Fulvestran, et du Letrozol, et induit une régression de la tumeur dans la xénogreffe.

1.4.4 Les effets secondaires de l'acide valproïque

Dans la littérature, de nombreux effets secondaires liés à l'utilisation clinique du VPA ont été décrits. Ces effets secondaires sont retrouvés avec de nombreux médicaments antiépileptiques (Hardy et al. 2001; Chateauvieux et al. 2010). Généralement, la plupart des effets secondaires sont bénins et transitoires chez les patients, mais les effets secondaires sont graves lors du développement embryonnaire, entraînant des altérations physiques et cognitives. Le VPA peut avoir des effets au niveau

dermatologique, sur la fertilité, la grossesse et le développement du fœtus et au niveau neurologique. Il peut aussi créer des dommages au niveau du foie ou des désordres hématologiques (Chateauvieux et al. 2010). Concernant les désordres hématologiques, des coagulopathies ont été décrites chez plus de 4% des enfants traités avec du VPA. Les symptômes retrouvés dans cette pathologie sont les thrombocytopénies, les dysfonctions plaquettaires, la maladie de von Willebrand, des déficits en facteur XIII, des hypofibrinogénémies, et des carences en facteurs vitamine K-dépendants (Kose et al. 2009; Chen et al. 2013). Deux hypothèses pourraient expliquer les thrombocytopénies et les dysfonctions plaquettaires. La première est que le VPA peut exercer une toxicité directe sur la moelle osseuse, ce qui diminue la production de cellules sanguines. La seconde hypothèse implique l'inclusion du VPA au niveau des membranes plaquettaires (similarité structurale et chimique avec les acides gras des membranes cellulaires). Cette modification de la membrane peut provoquer une réaction auto-immune, en raison de la production d'anticorps (immunoglobuline M) dirigés directement contre des thrombocytes circulants. Cette modification pourrait aussi provoquer une simple altération des propriétés de la membrane, ce qui expliquerait l'observation de la thrombocytopénie, sans diminution du nombre de plaquettes.

La maladie de von Willebrand induite par le VPA a été rapportée comme ayant une prévalence élevée (autour de 67% chez les enfants et 16% pour les patients adultes). Cette maladie entraîne des troubles hémorragiques. Les personnes atteintes de cette maladie présentent un problème au niveau du facteur von Willebrand essentiel à la coagulation normale du sang (Gerstner et al. 2006).

D’autres effets secondaires ont été décrits après l’utilisation du VPA, comme le développement d’anémies aplasiques dont la prévalence semble être augmentée de plus de 9 fois, comparé aux personnes non traitées (Handoko et al. 2006). Tout comme pour l’hépatotoxicité, il semble que l'anémie aplasique ait une prévalence plus élevée lors des poly-thérapies. Etant donné que l'anémie aplasique est un dysfonctionnement des cellules souches hématopoïétiques, qui arrête la production de globules rouges, certains résultats obtenus dans la littérature contredisent ceux qui suggèrent que le VPA est un puissant activateur de l'érythropoïèse chez les patients épileptiques (Kieslich et al. 2003). Cette étude a été réalisée sur 30 jeunes patients traités pendant plus de trois mois avec des doses de VPA anti-convulsantes et les

résultats montrent une augmentation de l'expression de l'hémoglobine fœtale, avec une stimulation qui dépend de la dose.

Face à l'importance de ces désordres hématologiques provoqués par le VPA, il semble important de déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels il peut agir, particulièrement sur le système hématopoïétique.

2 Objectifs du travail

2.1 Objectif général

Les patients atteints d'un cancer sont particulièrement sujets à des troubles hématologiques, notamment des anémies. L'acide valproïque (VPA) est considéré comme un agent anticancéreux potentiel par sa propriété inhibitrice des HDAC. Son utilisation en tant qu'antiépileptique a révélé, au cours des dernières décennies, de nombreux effets secondaires chez les patients sur le plan hématologique comme des thromboses et des anémies.

Des travaux précédents réalisés au laboratoire LBMCC ont montré que le VPA peut modifier l'homéostasie hématopoïétique, notamment en affectant l'érythropoïèse et en favorisant l'expression de marqueurs spécifiques de la mégacaryopoïèse et de la voie de différenciation granulo-monocytaire (Chateauvieux et al. 2011).

Face à ces résultats préliminaires, notre hypothèse de travail est la suivante : le VPA peut il générer un déséquilibre dans la régulation des différentes voies de différenciation, en agissant sur le réseau microARN/Facteurs de transcription dans le système hématopoïétique, en relation ou non avec sa propriété d'inhiber les HDAC?

2.2 Objectifs spécifiques

Afin de valider notre hypothèse générale, nous avons les objectifs suivants :

1. Etudier l'effet du VPA sur l'érythropoïèse au niveau cellulaire en utilisant comme modèles de différenciation érythroïde, la lignée érythroleucémique humaine TF1 et les cellules $CD34^+$ stimulées par l'Epo ainsi que la lignée érythroleucémique humaine K562 induites à se différencier par l'aclacinomycine (Acla). La différenciation érythroïde sera mise en évidence par l'analyse du taux de cellules hémoglobinisées (coloration à la benzidine) et par l'analyse par cytométrie de flux de l'expression de la protéine GPA. L'expression de la γ-globine sera également étudiée par western blot. L'effet du VPA

sur la viabilité et la prolifération cellulaires sera également analysé sur l'ensemble des modèles.

2. Analyser l'effet du VPA sur l'érythropoïèse au niveau moléculaire en nous focalisant principalement sur l'expression des microARN (miR) et des facteurs de transcription (FT) exprimés dans les cellules hématopoïétiques et impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse. Le niveau d'expression des miR-221, 222, 144, 451, 15a, et 16 et des protéines GATA-1, GATA-2, PU.1, NF-E2 et c-myb sera analysé respectivement par PCR en temps réel et par western blot. Nous nous arrêterons particulièrement sur le cluster de miR-144/451 dont le gène est régulé par GATA-1.

3. Compte tenu des différents modes d'action du VPA, l'implication de l'activité inhibitrice des HDAC dans l'inhibition de l'érythropoïèse n'est pas prouvée. Notre objectif sera de comparer l'effet du VPA à d'autres molécules comme le Valpromide (VPM), un analogue structural du VPA mais dépourvu de l'activité inhibitrice des HDAC et le MS-275, un inhibiteur d'HDAC de classe I sur l'érythropoïèse au niveau cellulaire et au niveau moléculaire.

4. Afin de vérifier que l'activité inhibitrice du VPA n'est pas un phénomène général sur l'hématopoïèse et que cette activité répond à des modifications de la régulation fine de la différenciation cellulaire, nous analyserons l'effet du VPA sur la différenciation mégacaryocytaire. La lignée mégacaryoblastique humaine Meg-01 ainsi que les cellules $CD34^+$ seront utilisées. Au niveau cellulaire, nous observerons les modifications morphologiques caractéristiques de la mégacaryopoïèse par coloration au May-Grünwald Giemsa et l'expression du marqueur spécifique CD61 sera analysée par cytométrie de flux.

5. Etudier au niveau moléculaire, dans les cellules Meg-01, l'effet du VPA sur l'expression des facteurs de transcription (GATA-1, GATA-2

et RUNX1) et des miR (221, 222, 144, 451 et 27a) spécifiquement impliqués dans la régulation de la mégacaryopoïèse. Les niveaux d'expression des protéines et des ARNm seront analysés respectivement par western blot et par PCR en temps réel. L'analyse de l'effet du VPA sur l'expression des facteurs de transcription impliqués, à la fois dans la régulation de la mégacaryopoïèse et de l'érythropoïèse, de manière opposée (GABP-α, RUNX1, ETS-1 et Fli-1), sera effectuée dans les cellules $CD34^+$ stimulées avec de l'Epo. Cette étude nous permettra d'observer l'effet du VPA sur la transition possible entre l'inhibition de l'érythropoïèse et l'induction de la mégacaryopoïèse.

3 Matériels et méthodes

3.1 Isolement et purification des cellules CD34$^+$

Les échantillons de sang de cordon ombilical sont obtenus auprès de donneurs sains consentants. La procédure protocolaire a été approuvée par le comité d'éthique de la maternité, Clinique Bohler au Luxembourg. Le sang de cordon est collecté dans des tubes de 50 mL contenant 20 U/mL d'héparine diluée dans 5 mL de PBS. Avant de procéder à l'isolement des CD34$^+$, le sang est d'abord dilué au 1:3 dans du PBS contenant 2 mM d'éthylène-diamine-tétra-acétate (EDTA, MP Biomedicals). Le sang dilué est délicatement déposé sur 15 mL de Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare, Pays-Bas). Les cellules mononucléées sont récupérées au niveau de l'interphase entre le plasma et le Ficoll, après centrifugation (16 min à 800g et à 20°C) puis lavées avec du PBS/EDTA. Avant de procéder à la purification sur colonne magnétique (Midi MACS CD34 Microbead Kit human, Miltenyi Biotec), 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 contenant 5% d'ASB et 2 mM d'EDTA, 100 μL de micro-billes CD34 et 100 μL d'agents bloquant pour 10^8 cellules. Cet agent empêche les liaisons aspécifiques, les interactions entre les billes et inhibe les protéases qui pourraient dégrader l'anticorps (Macs Miltenyi Biotec). Après incubation pendant 30 min à 4°C, la totalité est déposée sur une colonne équilibrée avec 2 mL de tampon MACS (LS, Macs Miltenyi) suivi de trois lavages successifs avec 3 mL de tampon MACS. L'élution est effectuée en utilisant 4 mL de tampon MACS. L'éluât est déposé sur une deuxième colonne équilibrée comme précédemment. L'élution finale est réalisée avec 4 mL de tampon MACS. Les cellules récupérées sont comptées et mises en culture à une concentration de $2x10^5$ cellules/mL dans du milieu Stem Line Medium II (Sigma, Belgique).

3.2 Culture cellulaire

Les cellules souches progénitrices hématopoïétiques CSH (CD34$^+$) sont cultivées dans du milieu Stem Line Medium II (Sigma, Belgique), dépourvu de sérum. Le

milieu est complété avec 10 U/mL de pénicilline/streptomycine (Sigma, Belgique) et un cocktail de cytokines comprenant de l'IL3 (Relia Tech, Allemagne), du SCF (Relia Tech, Allemagne) et de l'érythropoïétine (Epo) recombinante (epoetine béta, NeoRecormon, Roche). Le protocole de culture des cellules $CD34^+$ a été établi selon le protocole décrit par Carlile et al., (Carlile et al. 2004). Le VPA (Sigma, Belgique) est ajouté au jour 0 à une concentration de 1 mM en même temps que l'Epo (Figure 20). Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C, 95% d'humidité et 5% de CO_2. Le comptage des cellules se fait au bleu Trypan (Cambrex) en utilisant la cellule de Malassez (Marienfeld) au microscope optique à contraste de phase.

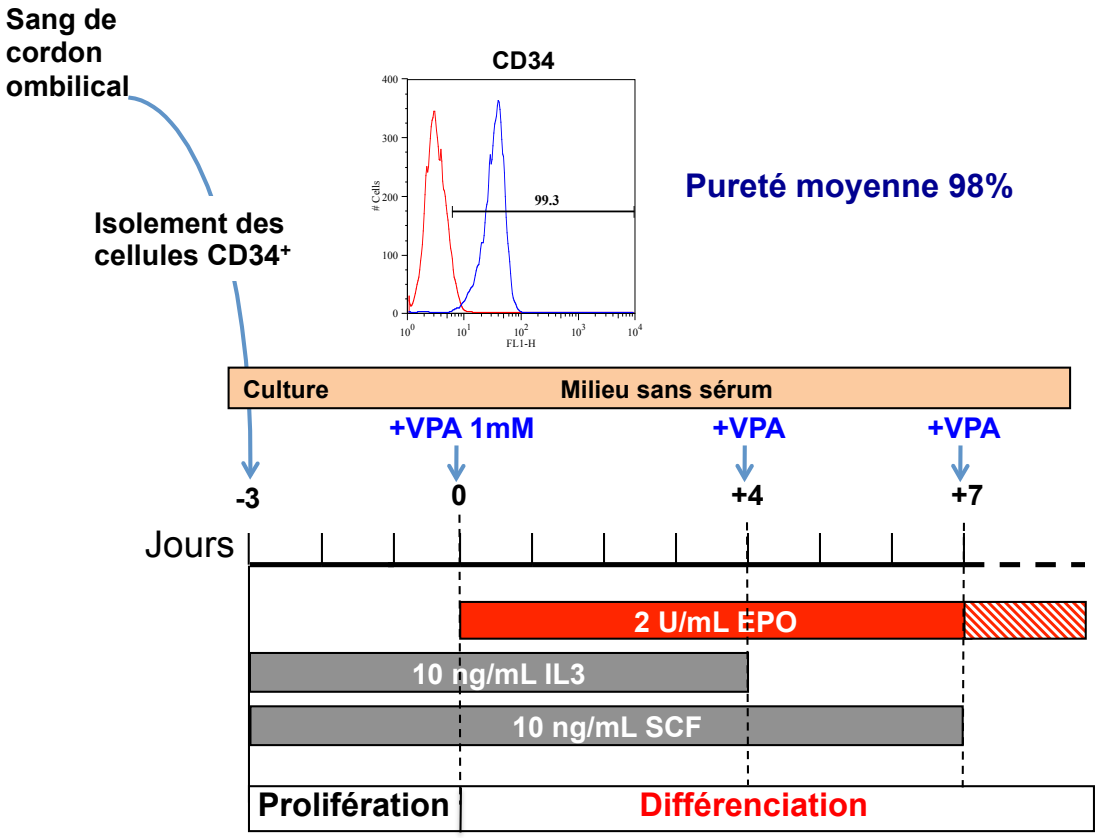


Figure 20 : Conditions de culture et de différenciation des cellules CD34$^+$

Les cellules CD34$^+$ sont cultivées dans du milieu sans sérum. Les cytokines (10 ng/mL de SCF, IL3 et 2U/mL d'Epo) et le VPA sont ajoutés 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 CD34$^+$ (J-3)

Les lignées cellulaires établies :

TF1 (DSMZ): Cette lignée a été établie, en 1987, à partir de la moelle osseuse d'un patient de 35 ans atteint d'une érythroleucémie (leucémie myéloïde aiguë, LMA M6) (Kitamura et al. 1989). Ces cellules prolifèrent sous l'effet de différents facteurs comme l'Epo, le granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), l'interféron gamma (IFNγ), les interleukines (IL)3, IL4, IL5, IL6 et le TNF-α. Ces cellules sont porteuses de l'oncoprotéine de fusion PML-RARα.

Meg-01 (DSMZ) : Cette lignée mégacaryoblastique a été établie en 1983, à partir de la moelle osseuse d'un patient de 55 ans atteint d'une leucémie myéloïde chronique (LMC). Les cellules sont porteuses du chromosome de Philadelphie donnant l'oncogène de fusion Bcr-Abl.

K562 (DSMZ) : Cette lignée a été établie en 1970, à partir de cellules prélevées dans le liquide pleural d'une patiente de 53 ans atteinte d'une leucémie myéloïde chronique (LMC) en phase blastique. Les cellules sont porteuses du chromosome de Philadelphie donnant l'oncogène de fusion Bcr-Abl.

Les trois lignées cellulaires utilisées sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Cambrex-Longa) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline 100U/mL, streptomycine 100µg/mL de Cambrex) et d'agents antifongiques (amphotéricine B à 25µg/mL). Le GM-CSF (5 ng/mL) (Pepro Tech) est ajouté dans le milieu des cellules TF1 pour assurer leur prolifération. Tous les trois jours, le milieu est renouvelé et les cellules sont reprises à une concentration de $2x10^5$ cellules/mL. Toutes les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C, 95% d'humidité et 5% de CO_2. Le comptage des cellules s'effectue sur cellule de Malassez (Marienfeld) au microscope optique à contraste de phase et la viabilité cellulaire est estimée par la méthode d'exclusion du bleu Trypan (Cambrex).

La différenciation érythroïde des cellules TF1 est obtenue par stimulation avec de l'Epo (10U/mL). Les cellules TF1 répondent à l'Epo après une dizaine de passages en culture suivant leur décongélation. Les cellules K562 peuvent être induites à produire de l'hémoglobine (Hb) avec 10 nM d'Acla. Les cellules Meg-01 sont induites vers la voie mégacaryocytaire avec de l'ester de phorbol TPA à 10 µM (Sigma). Les cellules sont traitées avec : 0,5 ou 1 mM de VPA (Sigma) ; 1 mM de VPM (Sigma) ; 0,1 µM

de MS-275 (Entinostat) (Enzo, Life Sciences, Anvers, Belgique) ou avec 1 μM de SAHA (Cayman Chemical Compagny., Bioconnect, Huissen, Pays-Bas).

3.3 Test à la benzidine

La méthode repose sur la capacité de l'Hb à réduire le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en oxygène (O_2) qui va oxyder la benzidine entrainant la coloration des cellules en bleu. Le chlorydrate de benzidine (Fluka Chimika) 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.

Trois cent mille 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 repris dans 100 μL de sérum physiologique (NaCl 0,9%). A cette suspension cellulaire sont ajoutés 50 μL d'un mélange de benzidine/H_2O_2 (500 μL de Benzidine 0,2% et 10 μL de H_2O_2 de Sigma). La réaction se réalise à l'obscurité, à température ambiante pendant 20 min. La suspension cellulaire est ensuite diluée dans 300 μL de NaCl 0,9%. Les cellules sont comptées sur cellule de Malassez, au microscope à contraste de phase. Le taux de cellules différenciées est exprimé en % de cellules synthétisant de l'hémoglobine (cellules bleues) par rapport à la population totale.

3.4 Cytométrie de flux

La cytométrie de 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 antigène/anticorps avec les propriétés des fluorochromes. Un anticorps conjugué à un fluorochrome, se fixe spécifiquement à un antigène de surface. L'immunofluorescence est dite directe si l'anticorps monoclonal employé est conjugué directement au fluorochrome.

Trois cent mille 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 μL de PBS 1X et 5 μL d'anticorps couplés à un fluorochrome (Tableau 2). 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 0,2%

de paraformaldéhyde 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 µL de PBS 1X. L'immunofluorescence est mesurée par un cytomètre FACSCalibur (Becton-Dickinson). L'étude statistique est basée sur 10000 événements par échantillon et a été réalisée à l'aide du programme FlowJo.

Tableau 2 : Anticorps utilisés pour la cytométrie de flux

Anticorps	**Fluorochrome**	**Référence**	**Contrôle isotypique**	**Référence**
CD61	FITC	F0803	IgG1,κ	BD555748
CD41a	FITC	BD555466	IgG1,κ	BD555748
CD235a	PE-Cy^{TM}5	BD 559944	IgG2b,κ	BD555744

3.5 Extraction des protéines totales

Environ 10^7 cellules sont lysées dans 250 µL d'un mélange composé de tampon de lyse MPER (Mammalian Protein Extraction Reagent, Pierce, Belgique), d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases: Complete (Roche), Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) à 1,65 mM (Sigma) et d'inhibiteurs de phosphatases : PhophoStop (Roche), fluorure de sodium NaF à 4,1 mM et d'ortho-vanadate (Sigma) à 0,8 mM. L'ensemble est placé 15 min sous agitation forte à 4°C, puis l'homogénat obtenu est centrifugé 15 min à 18000 *g* à 4°C. La concentration en protéines dans le lysat est dosée par la méthode de Bradford utilisant le réactif BioRad (BioRad Laboratories).

3.6 Extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques

Les protéines nucléaires et cytoplasmiques sont extraites à partir de $5x10^6$ à $1x10^7$ cellules selon la méthode de Schreiber (Schreiber et al. 1989). Les cellules sont lysées dans des détergents hypertoniques contenant des inhibiteurs de protéases. L'extraction se réalise dans la glace pour éviter la dénaturation des protéines. Les cellules sont lavées une fois avec du PBS 1X puis centrifugées pendant 5 min à 350 *g*. Le culot est

repris dans 400 µL de tampon A frais (Tableau 3) et la suspension cellulaire est mise dans la glace pendant 15 min. Après les 15 min, 25 µL d'Igepal 10% sont ajoutés. Le mélange est vigoureusement agité pendant 10 sec puis centrifugé pendant 30 sec à 18000 *g* à 4°C. Le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques est transféré dans un nouveau tube et le culot contenant les noyaux est repris dans 50 µL de tampon C frais. La suspension est vigoureusement agitée (agitation horizontale) pendant 15 min à 4°C. L'agitation est suivie d'une centrifugation de 5 min à 11000 *g* à 4°C. Le surnageant contenant les protéines nucléaires est réparti en aliquotes d'environ 10 µL qui sont conservés à -80°C (Figure 21). Le dosage des protéines se fait par la méthode de Bradford.

Tableau 3 : Composition des tampons A et C utilisés pour l'extraction des facteurs cytoplasmiques et nucléaires.

Toutes les concentrations correspondent aux concentrations finales.

Réactifs	Tampon A	Tampon C
HEPES pH 7,9	10 mM	20 mM
KCl	10 mM	/
EDTA pH 8	0,1 mM	1 mM
EGTA	0,1 mM	1 mM
DTT	1 mM	1 mM
PMSF	0,5 mM	0,5 mM
Complete	1X	1X
Ortho-Vanadate	1 mM	1 mM
NaF	5 mM	5 mM
phosphostop	1X	1X
Gycérol	/	20%
NaCl	/	400 mM
Eau Ultra-pure	Qsp 10 mL	Qsp 10 mL

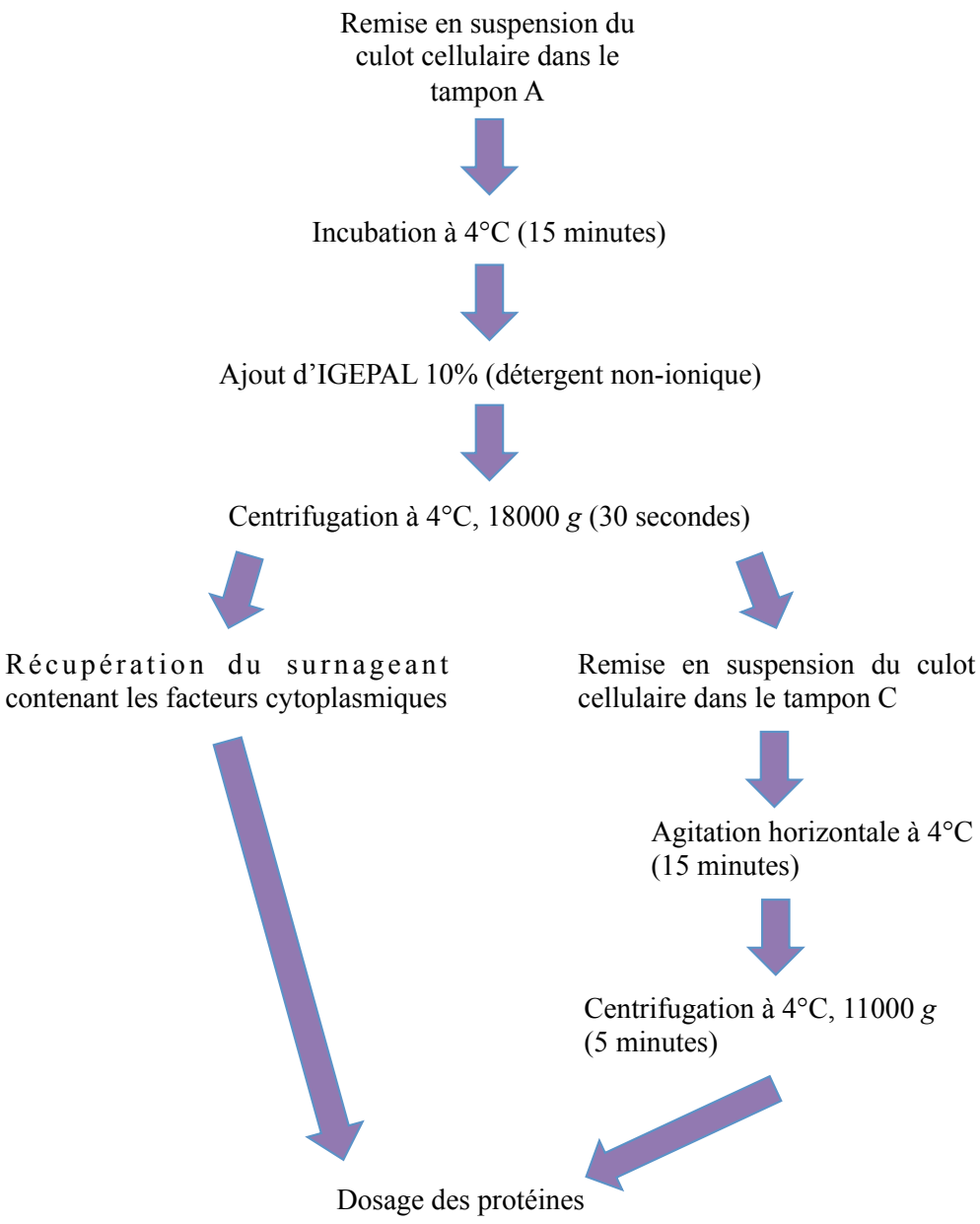


Figure 21 : Schéma récapitulatif du protocole d'extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires, (Adapté de (Schreiber et al. 1989))

3.7 Extraction acide des protéines

Les histones sont extraites à partir de $5x10^6$ cellules qui sont lysées dans 1 mL de tampon de lyse composé de Tris-HCl pH8 10 mM, KCL 1 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, DTT 1 mM, d'un inhibiteur de protéases 1X et d'un inhibiteur de phosphatase 1X (PhosStop, Roche). Le tout est placé 30 min à 4°C sous agitation douce. Ensuite, les cellules sont centrifugées pendant 10 min à 10000 *g* à 4°C. Après centrifugation, les culots contenant les noyaux sont lysés dans 400 µL d'acide sulfurique 0,1 M, puis placés sous agitation douce pendant 30 min à 4°C. L'agitation est suivie d'une centrifugation de 10 min à 13000 *g* à 4°C. Le surnageant est ensuite transféré dans un nouveau tube auquel est ajouté goutte à goutte de l'acide trichloracétique jusqu'à une concentration finale de 25%. Les échantillons sont ensuite placés environ 12h à 4°C. puis les protéines sont centrifugées 10 min à 13000 *g* à 4°C. Les culots contenants les histones sont lavés deux fois avec 500 µL d'acétone froide puis repris dans 100 µL d'eau. Le dosage des protéines se fait par la méthode de Bradford.

3.8 Dosage des protéines par la méthode de Bradford

40 µL de réactif de Bradford (Biorad) sont ajoutés à 160 µL d'une dilution appropriée de chaque échantillon. L'absorbance est lue à 590 nm avec l'appareil SpectraCountTM (Hewlett Packard) utilisé avec le logiciel Plate-Reader. La concentration en protéines des échantillons est déterminée grâce à l'équation de la droite obtenue avec la gamme standard d'ASB (1 à 20µg/mL),

3.9 Analyse de l'expression des protéines par western blot

Un volume d'extrait protéique correspondant exactement de 10 à 20 µg de protéines est ajouté à un volume équivalent de tampon de charge concentré 2X composé de β-mercaptoéthanol, de glycérol et de bleu de bromophénol, afin de réduire les ponts disulfures. La dénaturation des échantillons est réalisée par chauffage à 100°C pendant 5 minutes. Les protéines de l'extrait sont ensuite séparées en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS dénaturant (gel de concentration à 4% et gel de séparation à 10%). Après la migration, les protéines sont transférées par électrotransfert sur une membrane de polyvinylidene difluoride

(PVDF) (GE Healthcare). Les membranes sont bloquées dans du tampon phosphate alcalin / 0,1% Tween 20 (PBS-T) 1X, additionné de 5% de lait ou 5% d'ASB selon l'anticorps utilisé. Les membranes sont ensuite incubées en présence de l'anticorps primaire puis de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de Raifort (horseradish peroxidase, HRP) dans les conditions décrites dans le Tableau 4. Les membranes sont lavées entre chaque incubation par plusieurs bains successifs dans du PBS-T 1X sous agitation. L'activité peroxydasique de l'anticorps secondaire est révélée par chimioluminescence avec le substrat du système ECL+ (GE Healthcare). L'actine-β est utilisée comme contrôle de chargement des gels sauf pour les gels qui servent à l'analyse de l'acétylation de l'histone H4. Ces derniers ont été colorés avec une solution de bleu de Coomassie (0,05% p/v de bleu de Coomassie, 50% de méthanol et 10% d'acide acétique). La décoloration est réalisée grâce un mélange de méthanol (20%) et d'acide acétique (10%) pendant 45 min puis avec de l'eau distillée pendant 30 min. Les gels sont ensuite photographiés grâce à l'appareil Molecular Image® Gel Dox^{TM} XR (Biorad) associé au logiciel Quantity One.

Tableau 4 : 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% ASB* *Incubation:1 h, T. amb.*	*C-20 sc-1234X* *Dilution : 1/5000 (lait 5%)* *Incubation : 12 h, 4°C*	*Anti chèvre sc-2020* *Dilution : 1/3000 (lait 5%)*
GATA-1	*47*	*PBS-T - 5% lait* *Incubation:1 h, T. amb.*	*N1 SC-266X* *Dilution : 1/2500* *Incubation :12h, 4°C*	*Anti-rat sc-2006* *Dilution : 1/7000 (lait 5%)*
GATA2	*50*	*PBS-T - 5% lait* *Incubation : 1 h, T. amb*	*H-116 sc-9008* *Dilution:1/8000 (lait 5%)* *Incubation :1 h, T°C amb*	*Anti lapin sc-2313* *Dilution : 1/4000 (lait 5%)*
PU.1	*40*	*PBS-T - 5% lait* *Incubation : 12h, 4°C*	*Spi-1 T-21 sc-352* *Dilution : 1/500 (lait 5%)* *Incubation :1 h, T°C amb.*	*Anti lapin sc-2313* *Dilution : 1/1000 (lait 5%)*
NF-E2	*45*	*PBS-T - 5% lait* *Incubation : 1 h, T. amb*	*C-19 sc-291* *Dilution : 1/10000 (lait 5%)* *Incubation :1 h, T°C amb*	*Anti lapin sc-2313* *Dilution : 1/5000 (lait 5%)*
GABP-α	*60*	*PBS-T - 5% lait* *Incubation : 1 h, T. amb*	*H-180 sc-22810* *Dilution : 1/1000 (lait 5%)* *Incubation : 12 h, 4°C*	*Anti lapin sc-2313* *Dilution : 1/5000 (lait 5%)*

RUNX1	*20-52*	*PBS-T - 5% lait* *Incubation : 1 h, T. amb*	*H-65 sc-28679* *Dilution : 1/1000 (lait 5%)* *Incubation : 12 h, 4°C*	*Anti lapin sc-2313* *Dilution : 1/5000 (lait 5%)*
Fli-1	*50*	*PBS-T - 5% lait* *Incubation : 1 h, T. amb*	*C-19 sc-356* *Dilution : 1/1000 (lait 5%)* *Incubation : 12 h, 4°C*	*Anti lapin sc-2313* *Dilution : 1/5000 (lait 5%)*
TAL1	*40-44*	*PBS-T - 5% lait* *Incubation : 1 h, T. amb*	*H-60 sc-22809* *Dilution : 1/1000 (lait 5%)* *Incubation : 12 h, 4°C*	*Anti lapin sc-2313* *Dilution : 1/5000 (lait 5%)*
c-Myb	*75*	*PBS-T - 5% lait* *Incubation : 1 h, T. amb*	*C-19 sc-517* *Dilution : 1/1000 (lait 5%)* *Incubation : 12 h, 4°C*	*Anti lapin sc-2313* *Dilution : 1/5000 (lait 5%)*
ETS-1	*55*	*PBS-T - 5% lait* *Incubation : 1 h, T. amb*	*C-20 sc-350* *Dilution : 1/1000 (lait 5%)* *Incubation : 12 h, 4°C*	*Anti lapin sc-2313* *Dilution : 1/5000 (lait 5%)*
γ-globine	*18*	*PBS-T - 5% lait* *Incubation : 12h, T. amb*	*sc-21756* *Dilution : 1/8000 (lait 5%)* *Incubation : 12 h, 4°C*	*Anti souris sc-2005* *Dilution :1/10000 (lait 5%)*
Ago2	*97*	*PBS-T - 5% ASB* *Incubation:1 h, T. amb.*	*Cell signaling # 2897* *Dilution : 1/1000 (ASB 5%)* *Incubation : 12 h, 4°C*	*Anti lapin sc-2313* *Dilution : 1/1000 (lait 5%)*
Exportine 5	*136*	*PBS-T - 5% lait* *Incubation : 1 h, T. amb*	*sc-66885* *Dilution : 1/1000 (lait 5%)* *Incubation : 12 h, 4°C*	*Anti lapin sc-2313* *Dilution : 1/1000 (lait 5%)*
Bcl-2	*24-26*	*PBS-T - 5% lait* *Incubation : 1 h, T. amb*	*Calibiochem OP60* *Dilution : 1/2000 (lait 5%)* *Incubation : 12 h, 4°C*	*Anti mouse BD Pharmingen* *Dilution : 1/5000 (lait 5%)*
AKT	*60*	*PBS-T - 5% ASB* *Incubation: 1 h, T. amb*	*Cell signaling # 2967* *Dilution : 1/1000 (ASB 5%)* *Incubation : 12 h, 4°C*	*Anti lapin sc-2313* *Dilution : 1/1000 (lait 5%)*
c-myc	*62*	*PBS-T - 5% lait* *Incubation : 1 h, T. amb*	*BD 551101* *Dilution : 1/250 (lait 5%)* *Incubation : 12 h, 4°C*	*Anti souris sc-2005* *Dilution :1/1000 (lait 5%)*
Histone H4 acétylé	*10*	*PBS-T - 5% ASB* *Incubation: 1 h, T. amb*	*Millipore 06-866* *Dilution : 1/50000 (lait 5%)* *Incubation : 12 h, 4°C*	*Anti lapin sc-2313* *Dilution : 1/5000 (lait 5%)*
Histone H4	*10*	*PBS-T - 5% ASB* *Incubation: 1 h, T. amb*	*Millipore 05-858* *Dilution : 1/30000 (lait 5%)* *Incubation : 12 h, 4°C*	*Anti lapin sc-2313* *Dilution : 1/5000 (lait 5%)*

Actine-β	*42*	*PBS-T 5% lait* *Incubation : 1h, T. amb*	*A5441* *Sigma Aldrich* *Dilution : 1/20000 (lait 5%)* *Incubation :1h, T°C amb*	*Anti souris sc-2005* *Dilution :1/20000 (lait 5%)*
Acétyl Lysine		*PBS-T - 5% ASB* *Incubation: 1 h, T. amb*	*Millipore AB-3879* *Dilution : 1/5000 (ASB 5%)* *Incubation : 12 h, 4°C*	*Anti lapin sc-2313* *Dilution : 1/1000 (lait 5%)*
Lamine A/C	*65*	*PBS-T - 5% lait* *Incubation : 1h, T. amb*	*D-16 sc-31110* *Dilution : 1/200 (lait 5%)* *Incubation :1 h, T°C amb.*	*Anti chèvre sc-2020* *Dilution : 1/5000 (lait 5%)*

3.10 Immunoprécipitation protéique

Le protocole d'immunoprécipitation protéique se base sur le protocole proposé par Ribeil *et al.* (Ribeil et al. 2007). Deux cents µg de protéines totales ou nucléaires sont dilués au 1:3 dans de l'eau et 2 µg d'anticorps anti-GATA-1 C20 (sc-1234X) et 100 µL de protein G Microbeads (Miltenyi) sont ajoutés au mélange. Après incubation pendant 12h 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). L'immunocomplexe est immobilisé dans la colonne et lavé trois fois avec 200 µL de tampon de lyse. Vingt 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, sont appliqués sur la colonne pour l'équilibrer. 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 (Figure 22A). En parallèle, nous avons prélevé une aliquote de l'immunocomplexe, puis nous avons réalisé le western blot avec l'anticorps secondaire anti-rat, afin de vérifier la spécificité de l'anticorps secondaire anti-rat (Figure 22B).

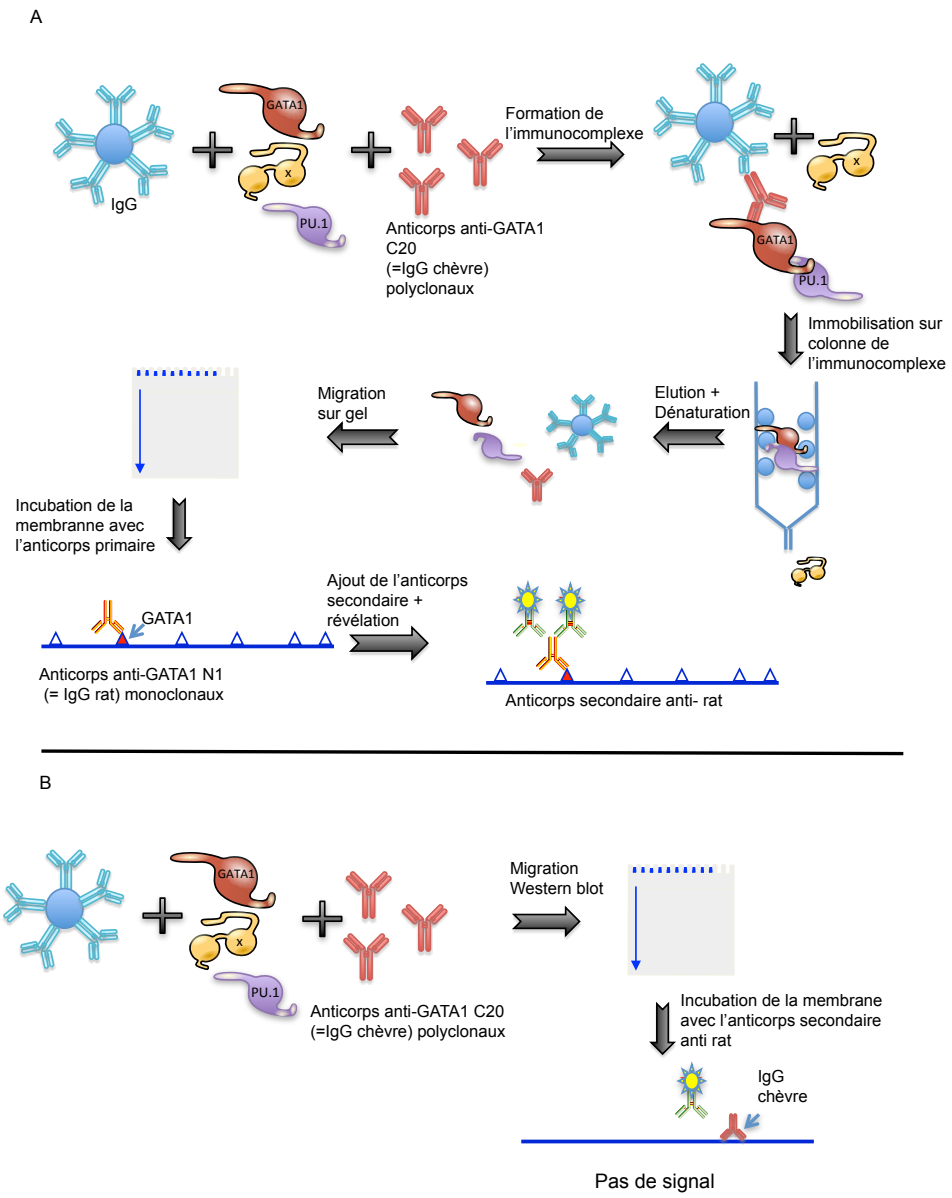


Figure 22 : Schéma explicatif de la technique d'immunoprécipitation

A : L'immunoprécipitation est réalisée à partir d'un mélange d'immunoglobulines Anti-IgG couplées à des billes magnétiques, d'extraits protéiques cytoplasmiques ou nucléaires et d'anticorps (IgG) anti-GATA-1 C20. Après les différentes étapes conduisant à l'isolation de l'immunocomplexe, ce dernier est dénaturé puis déposé dans un gel de polyacrylamide pour séparer les différentes protéines par électrophorèse. L'expression de GATA-1 et de ces partenaires est étudiée par western blot.

B : Afin de vérifier la spécificité de l'anticorps secondaire anti-rat, nous avons prélevé une aliquote de l'immunocomplexe puis nous avons réalisé le western blot avec l'anticorps secondaire anti-rat.

3.11 Extraction des ARN totaux

Tous les réactifs utilisés sont traités anti-ARNases. Les ARN totaux sont extraits à partir de 10^7 cellules. Les cellules sont lavées au PBS 1X, centrifugées à 350 *g* pendant 7 min, puis lysées avec le réactif TRIzol® (Invitrogen). Les ARN totaux sont séparés de l'ADN par addition de chloroforme et par centrifugation. Les ARN présents dans la phase aqueuse sont précipités en présence d'isopropanol. Les culots d'ARN totaux sont sédimentés par centrifugation à 4°C de 5 min à 10000 *g*, puis dissous dans de l'eau ultra-pure dépourvue de ARNase et quantifiés au spectrophotomètre (Nanodrop® ND-1000).

3.12 Transcription inverse

La SuperScript II™ Reverse Transcriptase (Invitrogen, 200 U/µL) est utilisée pour réaliser la transcription inverse de 5 µg d'ARN totaux. Un µL d'oligo(dT) (500 µg/mL) ainsi qu'1 µL de Mix dNTP (10 mM chaque) sont ajoutés aux ARN totaux, le tout complété avec de l'eau ultra pure (QSP 12 µL). Après 5 minutes à 65°C, 4 µL de tampon 5X First-Strand, 2 µL de DTT (0,1M) et 1 µL d'enzyme RNaseOUT™ (40 U/µL) sont additionnés au mélange et incubés à 42°C pendant 2 min. Un µL de transcriptase inverse (SuperScript™ II) est ajouté pendant 50 min à 42°C puis la réaction est inactivée en incubant le mélange à 70°C pendant 15 min. Pour finir 1 µL d'enzyme ARNase H (2U/µL) est additionné et le mélange est incubé à 37°C pendant 20 min afin d'éliminer l'ARN dans les duplexes ADN/ARN.

3.13 La transcription inverse des microARN

Contrairement aux ARNm, les microARN (miR) ne possèdent pas de queue poly (A). Ainsi, au cours de la transcription inverse, les miR sont polyadénylés par une polymérase poly(A). La transcription inverse est effectuée grâce au kit miScript Reverse Transcription (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) à partir d'1 µg d'ARN totaux. Le kit contient un mix pour la transcription inverse contenant les enzymes, polymérase poly (A) et transcriptase inverse ainsi qu'un tampon de transcription inverse. Ce tampon contient: des dNTP, des ions Mg^{2+}, des amorces oligo-dT et des amorces aléatoires. Les ARN totaux sont ajoutés à un mélange contenant: 4 µL de tampon de

transcription inverse, 1 µL du mix pour la transcriptase inverse et de l'eau dépourvue de ARNase QSP 20 µL.

Les échantillons sont ensuite incubés 60 min à 37°C puis 5 min à 95°C pour inactiver les enzymes. Les ADNc sont stockés à -20°C jusqu'à l'analyse par PCR en temps réel. Les amorces oligo-dT ont dotées d'une séquence universelle à l'extrémité 5'. Cette séquence permettra l'amplification des ADNc, lors de l'étape de PCR en temps réel.

3.14 PCR en temps réel

Les ADNc issus de la transcription inverse sont mélangés au mix « RT2 Real-TimeTM SYBR Green/ROX PCR Master Mix » (Superarray, Tebu-bio), contenant le tampon real-time PCR, l'ADN Taq polymérase HotStart, les nucléotides, le fluorochrome SYBR® Green. Vingt µL de ce mélange sont déposés dans des puits d'une microplaque auxquels sont ajoutés 5µL d'amorces nucléotidiques (Tableau 5A). La PCR en temps réel a été réalisée à l'aide de l'appareil 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) selon le programme suivant :

- 2 minutes à 50°C
- 10 minutes à 95°C pour activer la polymérase
- Dénaturation: 15 secondes à 95°C
- Hybridation: 1 minute à 60°C
- Elongation: 1 minute à 60°C

40 cycles

L'ADNc pour l'analyse des miR a été déposé dans une plaque 96 puits en présence d'une sonde universelle et d'une sonde spécifique d'un miR (Tableau 5B) et un mélange contenant le SYBR Green®, les enzymes et le tampon des enzymes.

La réaction d'amplification a été réalisée dans un thermocycleur de type 7300 (Applied Biosystems) selon le programme suivant :

- 15 minutes à 95°C pour activer la polymérase
- Dénaturation : 15 secondes à 94°C
- Hybridation : 30 secondes à 55°C
- Elongation : 30 secondes à 70°C

40 cycles

Les données sont ensuite analysées par la méthode du ΔΔCT et les valeurs brutes sont normalisées par rapport au gène de l'actine-β ou du RNU1A (pour les miR) dont l'expression reste stable au cours du traitement.

Tableau 5 : Séquences des amorces pour PCR et des miR

A : Séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées lors des expériences de PCR en temps réel.

B : Séquences des miR matures.

A

ARNm	Orientation	Séquence 5'-3'
GATA-1	Sens Anti-sens	AGG-CCA-CTA-CCT-ATG CCT-GCC-CGT-TTA-CTG
Actine	Sens Anti-sens	CTC-TTC-CAG-CCT-TCC-TTC-CT AGC-ACT-GTG-TTG-GCG-TAC-AG

B

miR	Séquence
miR-221	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC
miR-222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU
miR-15a	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU
miR-16 1	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
miR-451	AAACCGUUACCAUUACUGAGUU
miR-144	UACAGUAUAGAUGAUGUACU
miR-27a	UUCACAGUGGCUAAGUUCCGC
miR-140	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG
miR-155	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU

Tableau 6 : Equations utilisées pour le calcul des valeurs ΔCt et ΔΔCt

- $\Delta Ct_{\text{contrôle}} = Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{actine}}$
- $\Delta Ct_{\text{expérience}} = Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{actine}}$
- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{contrôle}} - \Delta Ct_{\text{expérience}}$
- $2^{-\Delta\Delta Ct}$ = Variation d'ADN

3.15 Coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG)

La coloration de May-Grünwald Giemsa est l'une des techniques utilisée 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, neutre, contenant un colorant acide, l'éosine, et un colorant basique, le bleu de méthylène. Le deuxième colorant est le Giemsa, 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 de 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.

Trois cent mille 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 re-suspendu dans 100 µL de PBS 1X. La suspension cellulaire est projetée sur une lame par cytocentrifugation (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 (Merck) diluée au 1:20e 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 de la caméra Leica.

3.16 Statistiques

Les données ont été analysées en utilisant le logiciel GraphPad Prism 6. Les groupes ont été comparés en utilisant le test t (deux conditions) ou ANOVA (plusieurs conditions). Dans le cas d'ANOVA, les moyennes des groupes ont été comparées

deux à deux en utilisant le test Holm-Sidak. La différence observée, entre la série « contrôle » et la série « traitée », est considérée comme significative pour des valeurs de $p < 0,0001$ représentées par ****, $p < 0,001$ représentées par ***, $p < 0,01$ représentées par ** et les valeurs de $p < 0,05$ représenté par *.

Les étoiles situées aux extrémités des courbes correspondent à l'effet global observé et celles situées directement au dessus des graphes correspondent aux valeurs de p entre les points indiqués.

Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± la déviation standard à la moyenne.

4 Résultats

Des travaux préalables réalisés au laboratoire LBMCC, ont montré que l'acide valproïque pouvait perturber l'homéostasie de l'hématopoïèse par l'inhibition de la différenciation érythroïde et l'activation de la voie myélo-monocytique (Chateauvieux et al. 2011).

Pour ce travail, nous avons étudié l'effet de l'acide valproïque (VPA) sur le réseau « facteurs de transcription/microARN » impliqué dans la régulation de l'hématopoïèse. Nous vérifierons l'effet du VPA sur les cellules souches hématopoïétiques (CSH) induites à se différencier en présence de cytokines.

4.1 Effet de l'acide valproïque sur l'érythropoïèse, au niveau cellulaire

Afin d'étudier l'effet du VPA sur la différenciation érythroïde, nous avons utilisé un modèle permettant de reproduire l'érythropoïèse *ex-vivo* à partir de cellules $CD34^+$ en présence d'érythropoïétine (Epo), le principal activateur de l'érythropoïèse. L'effet du VPA sur la différenciation de la lignée érythroleucémique humaine TF1 induite par l'Epo a également été étudié. Cette lignée constitue un modèle cellulaire plus homogène que les CSH pour les études moléculaires. La lignée érythroleucémique humaine K562 a été utilisée comme contrôle de l'effet du VPA indépendamment de l'Epo.

4.1.1 Effet de l'acide valproïque sur la différenciation des cellules TF1

La lignée leucémique humaine TF1 est dépendante de cytokines telles que l'Epo ou le GM-CSF pour sa croissance, sa survie et sa différenciation. Nous nous sommes intéressés à l'effet du VPA sur la différenciation érythroïde des cellules TF1 en présence d'Epo. Environ $4x10^5$ cellules ont été stimulées avec de l'Epo (10 U/mL) et traitées ou non avec 0,5 et 1 mM de VPA pendant 0, 6, 24 et 48h. L'effet du VPA sur la différenciation des cellules TF1 a été évalué par l'analyse par cytométrie de flux de

l'expression de la glycophorine A (GPA), un marqueur membranaire spécifique de la voie de différenciation érythroïde. Le test de coloration à la benzidine a également été utilisé, ce qui permet d'observer et de quantifier les cellules qui produisent de l'hémoglobine (Hb), le marqueur principal des cellules érythrocytaires différenciées. Les résultats exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF), montrent que le VPA utilisé à une concentration de 0,5 mM, n'a aucun effet significatif sur l'expression de la GPA après 6, 24 et 48h de traitement. Concernant l'effet d'1 mM de VPA sur la différenciation, les résultats montrent une diminution progressive de l'IMF. En effet, dans ces conditions l'IMF diminue d'environ 40% après 48h de traitement (Figure 23A).

Ces résultats ont été confirmés par le test de coloration à la benzidine et les résultats montrent qu'après 72h de culture en présence d'Epo (10 U/mL), 36,2% des cellules produisent de l'Hb et 34,8% pour les cellules traitées avec 0,5 mM de VPA (Figure 23B). Ceci confirme que le VPA utilisé à une concentration de 0,5 mM, n'a aucun effet sur la différenciation érythroïde comparé à l'Epo seule. Le taux de cellules TF1 benzidine positives (B+) induites par l'Epo devient significatif après 72h de traitement. Cependant, la viabilité des cellules TF1 co-traitées avec l'Epo et le VPA 1 mM est trop affectée pour réaliser le test à la benzidine à 72h (Figure 24A). Le pourcentage de cellules viables, déterminé par le test d'exclusion au bleu de Trypan, a été calculé en comparant le nombre de cellules totales avec le nombre de cellules mortes. Les résultats montrent que la viabilité cellulaire est plus affectée lorsque les cellules sont traitées avec 1 mM de VPA comparées à 0,5 mM. En effet, la viabilité cellulaire passe de 95,7% à 0h à 54,6% à 72h lorsque les cellules sont traitées avec 1 mM de VPA. En revanche, la viabilité est de 82,8 % à 72h lorsque les cellules sont traitées avec 0,5 mM de VPA. L'effet du VPA sur la prolifération cellulaire a été évalué en calculant le ratio entre le nombre de cellules en vie lorsque les cellules sont traitées avec de l'Epo ou co-traitées avec Epo/VPA 1 mM à chaque temps et le nombre de cellules viables au temps 0h. Les résultats montrent un effet cytostatique du VPA après 6h et 24h de traitement car les cellules traitées ont une croissance ralentie, avec une diminution de 1,2 fois à 24h comparée aux cellules traitées avec de l'Epo seule (E). Cet effet devient ensuite cytotoxique après 48h de traitement, avec une diminution de la prolifération cellulaire de 2 fois comparée aux cellules traitées avec de l'Epo seule. A 48h, le nombre de cellules viables est diminué de 2 fois, montrant un effet cytotoxique du VPA à ce temps (Figure 24B).

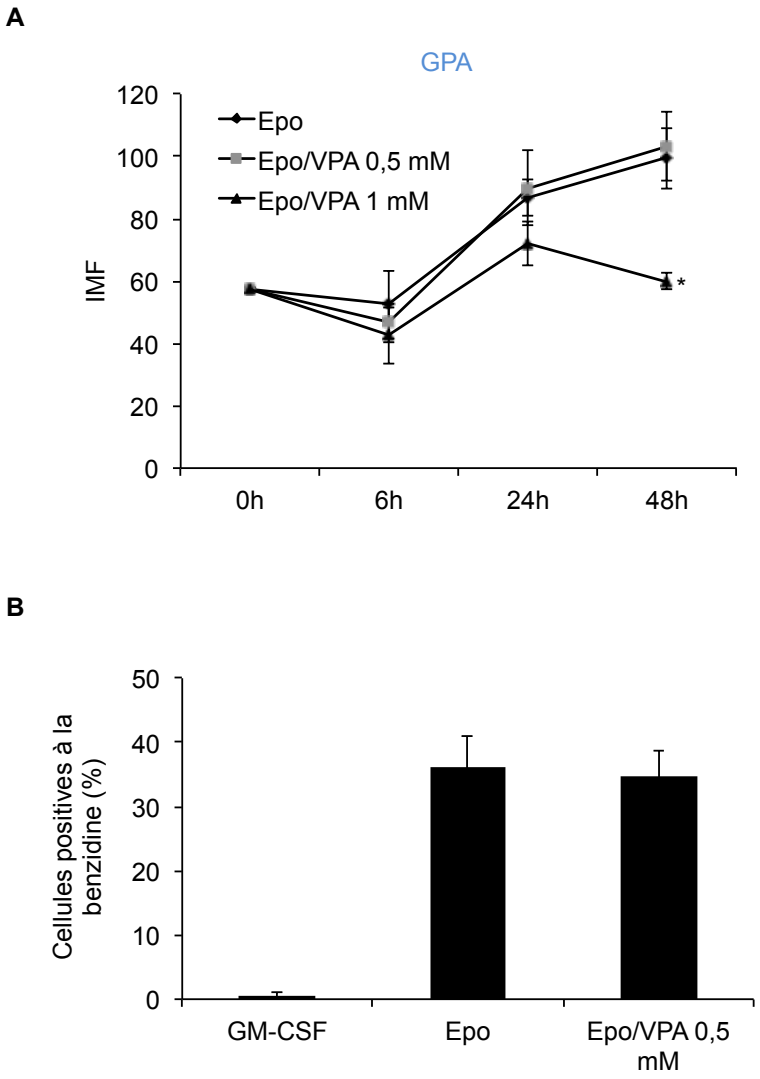


Figure 23 : Effet du VPA sur la différenciation érythroïde des cellules TF1

A. L'effet du VPA sur la différenciation érythroïde a été évalué grâce à l'analyse de l'expression de la glycophorine A (GPA) par cytométrie de flux. L'analyse est effectuée après 0, 6, 24 et 48h de traitement avec 0,5 et 1 mM de VPA. Le graphique représente l'IMF (intensité moyenne de fluorescence) en fonction du temps de traitement.

B. L'effet du VPA sur la différenciation érythroïde a été évalué grâce à un test de coloration à la benzidine sur les cellules TF1 traitées avec du GM-CSF (5 ng/mL) ou de l'Epo (10 U/mL) ou co-traitées avec Epo/VPA 0,5 mM pendant 72h.

Les résultats correspondent à la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. ****$p < 0,0001$, ***$p < 0,001$, **$p < 0,01$ et *$p < 0,05$.

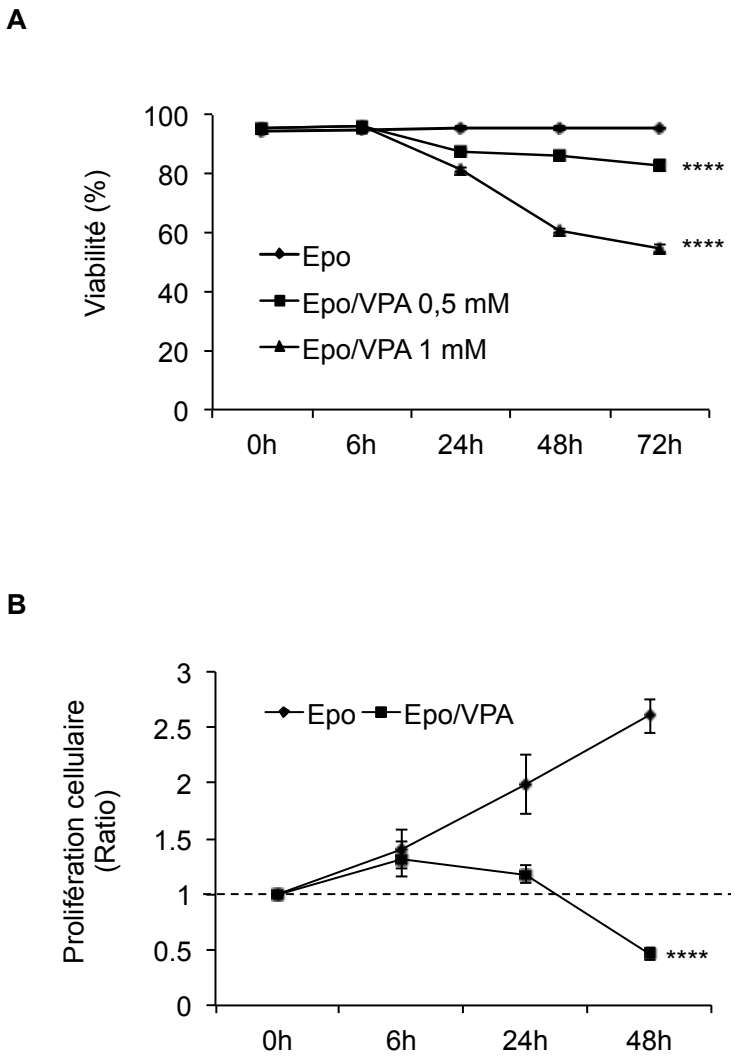


Figure 24 : Effet du VPA sur la viabilité et la prolifération des cellules TF1

Les cellules TF1 ont été traitées avec de l'Epo (10 U/mL) en présence ou non de VPA (0,5 ou 1 mM) pendant 0, 6, 24, 48 et 72h.

A. La viabilité cellulaire a été évaluée à tous les temps de traitement par le test d'exclusion au bleu Trypan et correspond au pourcentage de cellules viables par rapport au nombre de cellules total.

B. L'effet d'un mM de VPA a été analysé sur la prolifération des cellules TF1. Le nombre de cellules viables a été compté à chaque temps de traitement et comparé au nombre de cellules viables au temps 0h.

Les courbes correspondent à la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. ****$p < 0,0001$.

4.1.2 Effet de l'acide valproïque sur la différenciation des cellules $CD34^+$

L'effet du VPA sur la différenciation érythroïde a été confirmé dans les cellules $CD34^+$. Les cellules ont été stimulées pendant 4 jours avec de l'Epo et traitées ou non avec du VPA à une concentration de 1 mM. L'effet du VPA sur l'expression de la GPA a été étudié par cytométrie de flux. Les résultats exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF), montrent qu'après 4 jours de traitement, le VPA diminue l'expression de la GPA de façon significative (Figure 25A). En effet, nous pouvons noter une diminution de l'IMF de 34% lorsque les cellules sont traitées avec du VPA. Ces résultats ont été confirmés par le test de coloration à la benzidine. Après 4 jours de culture en présence d'Epo seule, 20% des CSH produisent de l'Hb contre 7% pour les cellules traitées par 1 mM de VPA (Figure 25B). Le VPA a donc un effet inhibiteur sur l'érythropoïèse, se traduisant par un blocage de la production d'Hb. Le VPA utilisé à 1 mM n'a pas d'effet cytotoxique sur les CSH après 4 jours de traitement puisque la viabilité est de 93,6 % et identique à celle des cellules stimulées avec de l'Epo seule. Nous pouvons donc conclure que l'inhibition de la différenciation est indépendante d'une induction de la mort cellulaire. En revanche, la viabilité n'est que de 55% après 7 jours de traitement (Figure 26).

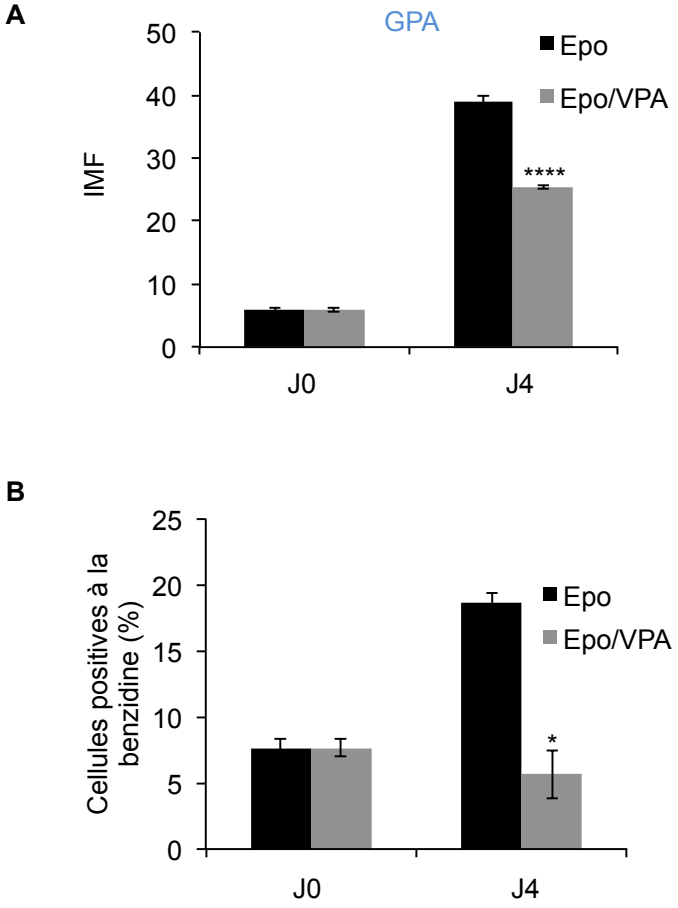


Figure 25 : Effet du VPA sur la différenciation des cellules CD34$^+$

Les CSH ont été stimulées à l'Epo (2 U/mL) et traitées ou non avec 1 mM de VPA pendant 4 jours (J4).

A. Le marqueur érythroïde GPA a été analysé par cytométrie de flux. Les histogrammes correspondent à l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) en fonction du temps de traitement au VPA. J0: Jour 0, J4: Jour 4

B. L'effet du VPA sur la différenciation érythroïde a été évalué grâce à un test de coloration à la benzidine sur les cellules CD34$^+$.

Les histogrammes correspondent à la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. ****$p < 0,0001$, ***$p < 0,001$, **$p < 0,01$ et *$p < 0,05$.

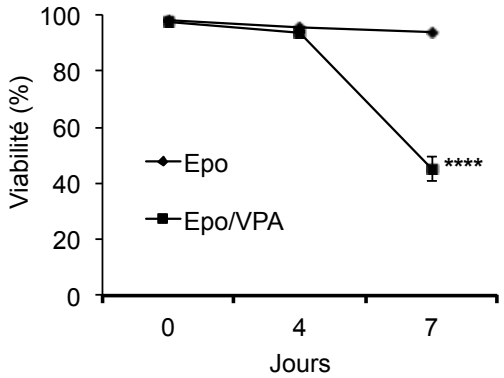


Figure 26 : Effet du VPA sur la viabilité des cellules CD34$^+$

La viabilité cellulaire a été déterminée après 4 ou 7 jours de traitement avec 2 U/mL d'Epo et traitées ou non avec 1 mM de VPA.

La viabilité cellulaire a été déterminée par le test d'exclusion au bleu de Trypan. Le pourcentage de cellules viables a été déterminé après 4 et 7 jours de traitement. Les courbes correspondent à la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. ****$p < 0,0001$, ***$p < 0,001$, **$p < 0,01$ et *$p < 0,05$.

En conclusion, nous avons montré que le VPA utilisé à une concentration de 1 mM est capable d'inhiber la différenciation érythroïde des cellules $CD34^+$ après 4 jours de traitement. De plus, les résultats montrent que le VPA inhibe la différenciation induite par l'Epo de manière comparable dans les CSH et dans la lignée TF1 (diminution du marqueur GPA). En revanche 0,5 mM de VPA n'a pas d'effet sur la différenciation. Les cellules TF1 pourront donc être utilisées comme modèle pour les analyses de l'effet du VPA au niveau moléculaire.

4.2 Effet de l'acide valproïque sur l'érythropoïèse, au niveau moléculaire

4.2.1 L'acide valproïque module l'expression des miR impliqués dans l'érythropoïèse

De nombreux miR impliqués dans le contrôle de l'hématopoïèse ont été identifiés au cours des dernières années. Certains ont été décrits comme des régulateurs importants de l'expression des gènes spécifiques de l'érythropoïèse. Nous avons décidé d'étudier l'effet du VPA sur l'expression de certains miR matures comme les miR-221, miR-222, miR-15a, miR-451, miR-144 et miR-16. Ces miR sont impliqués dans la maturation et la prolifération des cellules érythroïdes précoces, dans la régulation de l'expression des gènes de la γ-globine fœtale et dans le contrôle de l'énucléation (Bianchi et al. 2012). L'effet du VPA sur l'expression de ces miR a été étudié dans les cellules TF1, stimulées à l'Epo (10 U/mL) et traitées pendant 6, 24 et 72h avec 1 mM de VPA. Les résultats de PCR en temps réels montrent que le VPA est capable de modifier l'expression de tous les miR dans ces cellules (Figure 27A). Tous les miR étudiés voient leur expression diminuer, excepté pour le miR-221, ce qui montre que la diminution de l'expression des miR n'est pas dûe à un effet inhibiteur général du VPA.

Afin de vérifier si l'effet du VPA sur l'expression des miR est liée à la stimulation des cellules par l'Epo, nous avons analysé l'expression de ces miR dans les cellules K562 traitées au VPA seul (Figure 27B). La lignée érythroleucémique humaine K562 est non dépendante de l'Epo pour sa survie et sa différenciation. Les cellules K562 expriment des marqueurs érythroïdes spécifiques et peuvent être induites à produire de l'hémoglobine par des agents chimiques (la doxorubicine, l'aclarubicine, l'hémine…), y compris des inhibiteurs d'HDAC (butyrate de sodium). Dans ces cellules, l'expression des miR-221, 222, 144 et 451 varie selon la même tendance que dans les cellules TF1. Les résultats de PCR en temps réel montrent que seule l'expression des miR-144 et 451 est diminuée de façon significative dès 6h de traitement au VPA. Cette diminution est indépendante de la mort cellulaire puisque dans les cellules K562, l'effet du VPA sur la viabilité et la prolifération cellulaires

reste très faible. Le pourcentage de cellules viables, déterminé par le test d'exclusion au bleu de Trypan, a été calculé en comparant le nombre de cellules totales avec le nombre de cellules mortes. Les cellules K562 ont été traitées avec 1 mM de VPA pendant 0, 6, 24, 48 et 72h. Les résultats montrent que la viabilité cellulaire n'est pas affectée par le traitement puisque le pourcentage de cellules viables, de 97% après 72h, est identique à celui obtenu dans les cellules non traitées (Figure 28A). Concernant la prolifération cellulaire, l'effet du VPA a été évalué en calculant le ratio entre le nombre de cellules viables traitées ou non traitées avec 1 mM de VPA à chaque temps et le nombre de cellules viables au temps 0h. Les résultats montrent un effet cytostatique du VPA à 48h de traitement car les cellules traitées (VPA) ont une croissance ralentie comparées aux cellules non traitées (C) (Figure 28B).

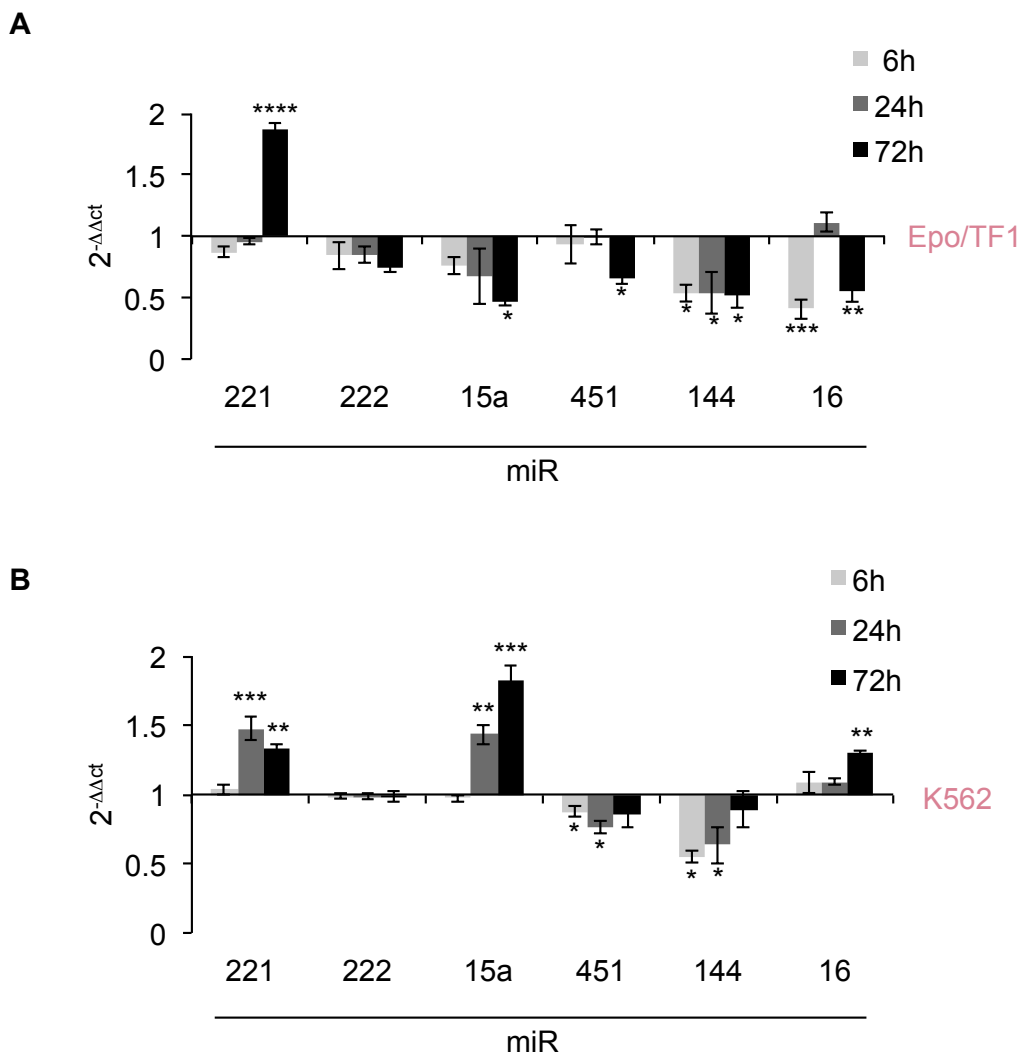


Figure 27 : Effet du VPA sur l'expression des miR impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse dans les cellules TF1 et K562

Les ARN totaux ont été extraits et analysés par PCR en temps réel pour l'expression des miR-221, 222, 15a, 451, 144 et 16.

A. Les cellules TF1 ont été stimulées avec de l'Epo (10 U/mL) et traitées ou non avec 1 mM de VPA pendant 6, 24 et 72h.

B. Les cellules K562 ont été traitées ou non avec 1 mM de VPA pendant 6, 24 et 72h.

Les résultats ont été normalisés par rapport au gène de ménage RNU1A et calculés par la méthode du ΔΔCt. L'expérience a été réalisée 3 fois. Les données des histogrammes représentent la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. ****$p < 0,0001$, ***$p < 0,001$, **$p < 0,01$ et *$p < 0,05$.

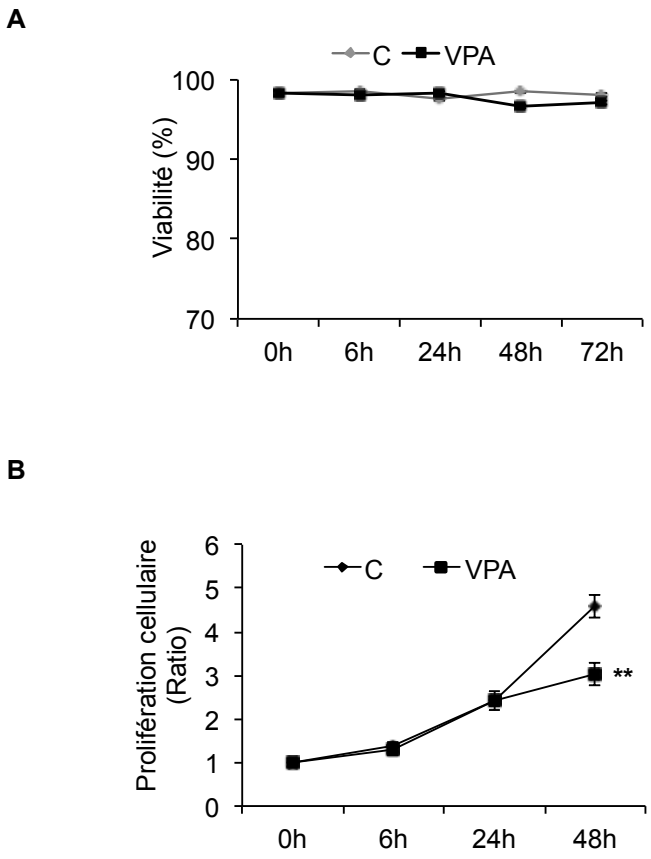


Figure 28 : Effet du VPA sur la viabilité et la prolifération cellulaire des cellules K562

Les cellules K562 ont été traitées ou non (C) avec 1 mM de VPA pendant 0, 6, 24, 48 et 72h.

A. Le nombre de cellules viables a été déterminé par le test d'exclusion au bleu Trypan.

B. L'effet d'1 mM de VPA a été analysé sur la prolifération cellulaire. La prolifération cellulaire est exprimée sous forme d'un ratio entre le nombre de cellules viables comptées à chaque temps et le nombre de cellules viables comptées au temps 0h.

Les courbes correspondent à la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. **$p < 0,01$.

En conclusion, ces résultats montrent clairement que le VPA peut moduler l'expression des miR impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse. De plus, l'utilisation des cellules K562 a permis de montrer que l'effet inhibiteur du VPA sur l'expression des miR-144 et 451 n'est pas spécifique des cellules TF1 et que l'Epo n'est pas impliquée dans ce processus. L'étude de la viabilité des cellules K562 montre également que la diminution de l'expression des miR n'est pas dû à la mort cellulaire.

4.2.2 L'acide valproïque diminue la transcription des miR-144/451, en corrélation avec l'inhibition de la différenciation érythroïde et la diminution de l'expression de GATA-1

Les résultats précédents ont montré que l'expression des miR-144 et 451 est diminuée à la fois dans les cellules TF1 stimulées à l'Epo et dans les cellules K562. Dans la littérature, il est décrit que le gène du cluster de miR-144/451 est positivement régulé par le facteur de transcription GATA-1.

Les miR-144 et 451 étant considérés comme des miR érythro-spécifiques, nous avons évalué leur expression dans les cellules TF1 traitées pendant 72h avec de l'Epo ou du GM-CSF. L'analyse par PCR en temps réel a montré une augmentation très importante de l'expression des miR-144 et 451 dans les cellules stimulées à l'Epo. Les résultats montrent une augmentation de 35 et 50 fois pour l'expression des miR-144 et 451 respectivement, comparée aux cellules contrôles non stimulées. Le GM-CSF induit seulement une augmentation de l'expression de ces miR de 10 et 12 fois comparées aux cellules non induites (Figure 29A). Ces résultats confirment donc que les miR-144 et 451 sont surexprimés lorsque les cellules sont stimulées par l'Epo afin de les différencier vers la voie érythroïde. De plus, nous avons analysé la capacité de l'Epo à induire la surexpression du facteur de transcription GATA-1. Les résultats obtenus par western blot montrent que le niveau d'expression de GATA-1 dans les cellules stimulées au GM-CSF ou à l'Epo est en corrélation avec le niveau d'expression des miR-144 et 451. L'expression de GATA-1 est plus importante dans les cellules stimulées à l'Epo que dans les cellules stimulées au GM-CSF. Le co-traitement Epo/GM-CSF confirme que l'Epo est bien un inducteur de l'expression de GATA-1 dans les cellules TF1 (Figure 29B). Nous avons également analysé l'expression de GATA-1 dans les cellules TF1 et K562 traitées avec 1 mM de VPA pendant 6, 24 et 48h. Les résultats obtenus par western blot montrent une diminution significative de l'expression de GATA-1 dès 6h de traitement, dans les deux lignées cellulaires (Figure 30). Ces résultats sont donc en corrélation avec la diminution de l'expression des miR-144 et 451 décrite précédemment.

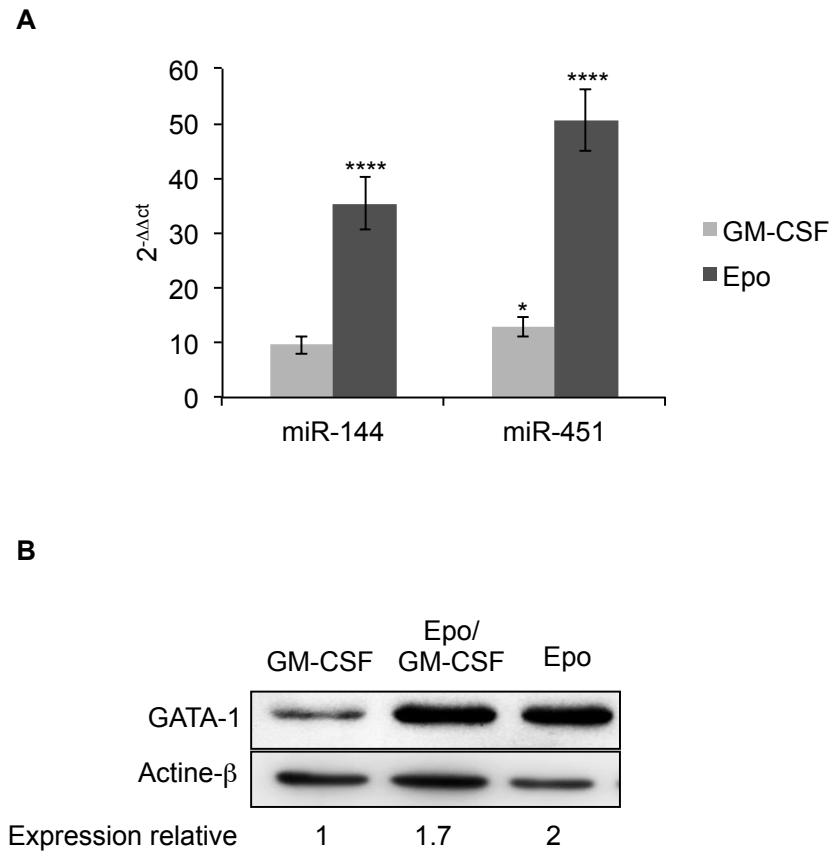


Figure 29 : Effet de l'Epo et du GM-CSF sur l'expression des miR-144 et 451 et sur l'expression de GATA-1

Les cellules TF1 ont été stimulées avec de l'Epo (10 U/mL) ou avec 5 ng/mL de GM-CSF pendant 72h.

A. Les ARN 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 au gène de ménage RNU1A et calculés par la méthode du ΔΔCt.

B. L'expression de GATA-1 a été analysée par la technique de western blot, à partir d'extraits protéiques nucléaires. L'actine-β est utilisée comme contrôle de dépôt. Les valeurs en dessous du western blot correspondent aux quantifications de l'expression de GATA-1 rapportée à l'actine et normalisée par rapport au contrôle. Les expériences ont été réalisées 3 fois. Les données des histogrammes représentent la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. *$p < 0,05$.

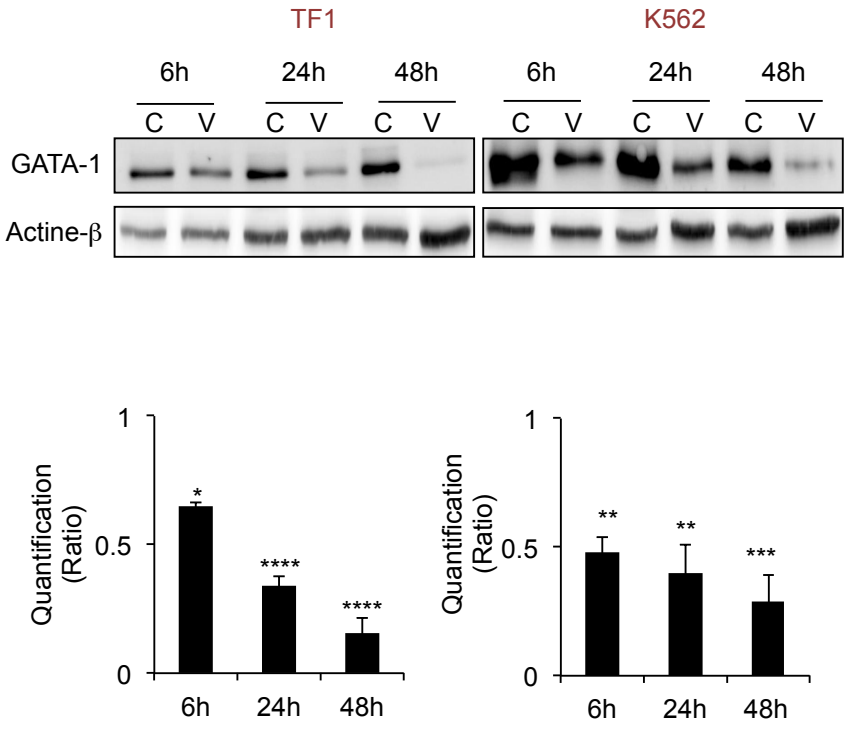


Figure 30 : Analyse de l'expression du facteur de transcription GATA-1 dans les cellules TF1 et K562 traitées au VPA pendant 6, 24 et 48h

Les western blots ont été réalisés à partir d'extraits protéiques nucléaires.

A : Les TF1 ont été stimulées avec de l'Epo (10 U/mL) puis traitées ou non avec 1 mM de VPA pendant 6, 24 et 48h.

B : Les K562 ont été traitées ou non avec 1 mM de VPA pendant 6, 24 et 48h.

Les graphes représentent les quantifications des bandes sur les blots correspondant à l'expression de GATA-1 dans les cellules TF1 (à gauche) ou dans les cellules K562 (à droite). L'expression de GATA-1 est rapportée à l'expression de l'actine-β et normalisée par rapport au contrôle = 1. Les données représentent la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. ****$p < 0,0001$, ***$p < 0,001$, **$p < 0,01$ et *$p < 0,05$.

Afin de vérifier la corrélation entre l'expression des miR-144 et 451 et l'expression de GATA-1, nous avons analysé l'effet du VPA sur l'expression des deux miR matures et du pré-miR-144 dans les cellules K562 induites avec de l'aclacinomycine (Acla). L'Acla induit la différenciation érythroïde des cellules K562, principalement caractérisée par la production d'hémoglobine, en corrélation avec une surexpression de GATA-1. L'expression des miR matures et du pré-miR a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats montrent une augmentation de l'expression des miR matures, dans les cellules K562 induites avec de l'Acla (A) (Figure 31A). Cette augmentation est inhibée lorsque les cellules sont co-traitées avec du VPA (A/V). Ce dernier résultat confirme que l'activité inhibitrice du VPA au niveau de l'expression des miR, n'est pas directement liée à la signalisation Epo/EpoR. L'expression du pré-miR (144/451) a été analysée grâce à l'utilisation d'un primer spécifique (pré-miR-144), ciblant spécifiquement la boucle du miR-144 dans le pré-miR-144/451. Les résultats obtenus par PCR en temps réel, montrent que l'expression du pré-miR-144/451 est augmentée lorsque les cellules sont traitées avec de l'Acla (A) comparé aux cellules contrôles (C) (Figure 31A). Dans ces conditions, le VPA est aussi capable d'inhiber 53% de l'induction du pré-miR-144/451, prouvant que le VPA agit sur l'expression des gènes des miR-144/451, avant le processing donc au niveau transcriptionnel. L'analyse de l'expression de GATA-1 par western blot, nous a permis de corréler la variation d'expression des miR-144 et 451, à la variation d'expression de GATA-1. Les résultats obtenus par western blot montrent que l'expression de GATA-1 est augmentée lorsque les cellules sont traitées avec de l'Acla et que son expression est diminuée lorsque les cellules sont co-traitées avec de l'Acla et du VPA (A/V) (Figure 31B). Ces résultats sont donc en accord avec les résultats obtenus sur les miR. Dans les cellules TF1, nous avons analysé par western blot l'expression des protéines Argonaute 2 (Ago2) et Exportine 5, qui sont toutes les deux impliquées dans la régulation de la biogénèse des miR (Figure 32). Les résultats montrent que le VPA n'a pas d'effet sur l'expression de ces deux protéines, ce qui conforte l'hypothèse que le VPA agirait au niveau transcriptionnel pour moduler l'expression du gène de miR-144/451.

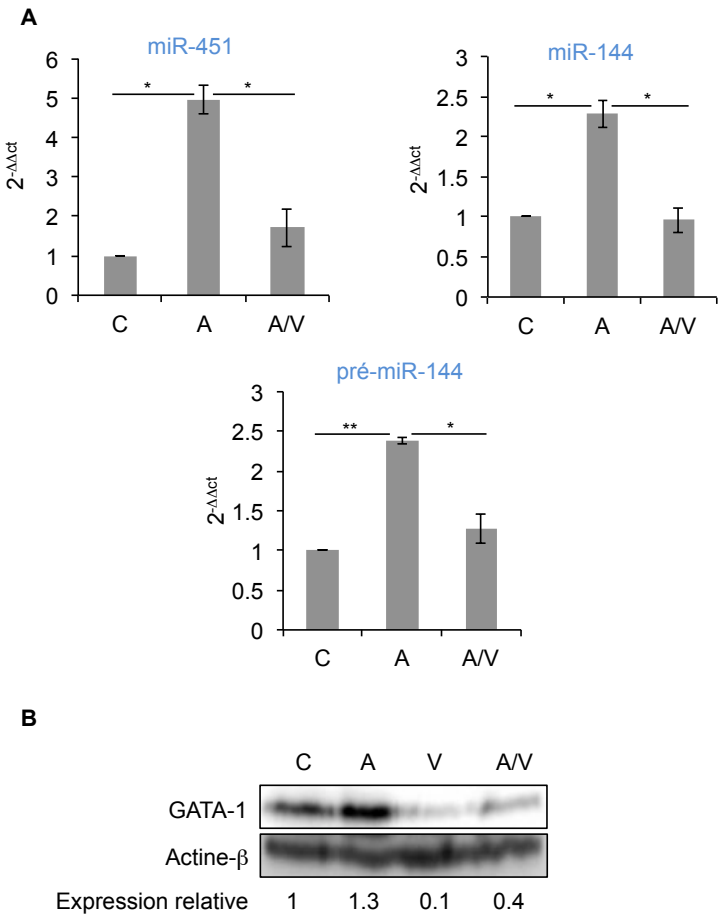


Figure 31 : Effet du VPA sur l'expression des miR-144/451 matures, du pré-miR-144/451 et de GATA-1 dans les cellules K562 induites à se différencier avec de l'aclacinomycine

Les cellules K562 ont été traitées avec de l'aclacinomycine (A) et/ou avec 1 mM de VPA (V) pendant 72h.

A. Les ARN totaux ont été extraits et analysés par PCR en temps réel pour l'expression des miR-144 et 451 et du pré-miR-144/451. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène de ménage RNU1A et calculés par la méthode du ΔΔCt.

B. Les western blots ont été réalisés à partir d'extraits protéiques nucléaires. L'actine-β est utilisée comme contrôle de chargement. Les valeurs situées en dessous du western blot correspondent aux quantifications de l'expression de GATA-1.

Les données représentent la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. **$p < 0,01$ et *$p < 0,05$.

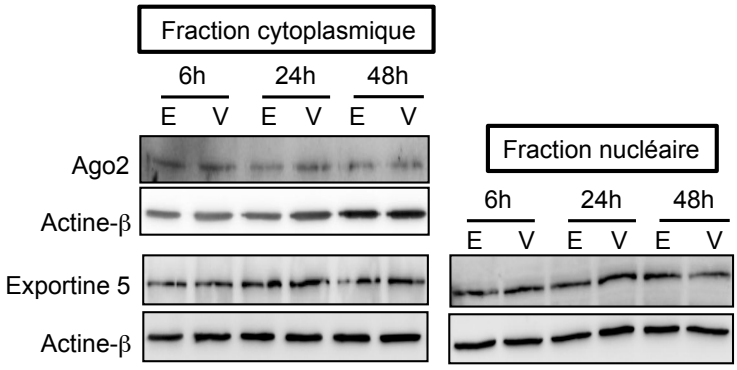


Figure 32 : Effet du VPA sur l'expression de protéines impliquées dans la biogénèse des miR

Les TF1 ont été stimulées avec de l'Epo (10 U/mL) puis traitées avec 1 mM de VPA pendant 6, 24 et 48h.

Les western blots ont été réalisés à partir d'extraits protéiques cytoplasmiques et nucléaires. L'actine-β est utilisée comme contrôle de chargement. Les résultats montrent une expérience représentative parmi 3.

La viabilité des cellules K562 a été analysée pour vérifier que l'effet inhibiteur du VPA observé sur l'expression des miR et de GATA-1, n'était pas dû à un effet cytotoxique. Les cellules K562 ont été traitées pendant 72h avec de l'Acla (A), du VPA (V) seuls ou co-traitées avec de l'Acla et du VPA (A/V). La viabilité des cellules a été déterminée par le test d'exclusion au bleu de Trypan et les résultats montrent que les différents traitements n'affectent pas la viabilité des cellules K562 (Figure 33). L'effet du VPA sur l'expression des miR matures et pré-miR, ainsi que sur GATA-1 dans les cellules induites avec de l'Acla, n'est pas dû à un effet cytotoxique du VPA.

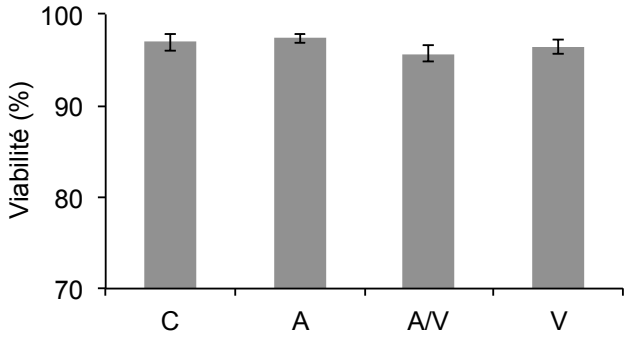


Figure 33 : Analyse de l'effet de l'aclacinomycine et du VPA sur la viabilité des cellules K562

Les cellules K562 ont été traitées par l'aclacinomycine (A) et/ou 1 mM de VPA (A/V ou V) pendant 72h. Le nombre de cellules viables a été déterminé par le test d'exclusion au bleu Trypan.

Les résultats correspondent à la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. **$p < 0,01$.

4.2.3 L'acide valproïque inhibe l'expression des miR-144/451 et augmente l'interaction entre GATA-1 et PU.1 dans les cellules CD34$^+$

Après avoir analysé dans les lignées TF1 et K562 l'effet du VPA sur l'expression des miR impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse, nous avons voulu vérifier son effet sur l'expression des miR-144 et 451 dans les CSH. Les cellules CD34$^+$ ont été stimulées avec de l'Epo et traitées ou non avec 1 mM de VPA pendant 4 jours. L'analyse de l'expression des miR-144 et 451, par PCR en temps réel, a montré une diminution significative de leur expression lorsque les cellules sont traitées avec du VPA (Figure 34A). Ce résultat confirme l'habilité du VPA à inhiber l'expression de ces miR dans les conditions de différenciation érythroïde.

Nous avons également analysé l'expression du facteur de transcription GATA-1 qui régule l'expression de ces deux miR. D'après les résultats obtenus par western blot, le VPA n'entraîne aucun changement au niveau de l'expression de GATA-1 dans ces cellules. L'expression du facteur de transcription NF-E2, un autre facteur positivement impliqué dans la voie de différenciation érythroïde, n'est pas modifié non plus (Figure 34B). Nous avons ensuite étudié l'expression de facteurs impliqués dans la régulation négative de l'érythropoïèse comme GATA-2 et PU.1. Ces deux facteurs de transcription vont agir de façon négative sur l'érythropoïèse, *via* la diminution de l'expression ou de l'activité transcriptionnelle de GATA-1. Les résultats obtenus par western blot décrivent une augmentation de l'expression de PU.1 et de GATA-2 (Figure 34B). En effet, une surexpression de GATA-2 dans des érythroblastes est en accord avec un blocage de la l'érythropoïèse. En ce qui concerne l'expression de PU.1, qui est un facteur capable de bloquer la différenciation du proérythroblaste en interagissant avec GATA-1, son augmentation est donc en accord avec l'inhibition de la différenciation par le VPA observée précédemment au niveau cellulaire. De plus, l'augmentation de l'expression de PU.1 est en corrélation avec la diminution de l'expression du miR-155, connu pour cibler la région 3'NT de l'ARNm de PU.1. En effet, les résultats de PCR en temps réel montrent une diminution de l'expression du miR-155 dans les cellules CD34$^+$ traitées avec 1 mM de VPA pendant 4 jours (Figure 34A).

Le facteur PU.1 est un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle du facteur GATA-1. En interagissant avec GATA1, PU.1 bloque la liaison de GATA-1 à l'ADN et son activité transcriptionnelle. Par la technique d'immunoprécipitation, nous avons analysé l'effet du VPA sur l'interaction GATA-1/PU.1. Les résultats montrent que le VPA est capable d'augmenter l'interaction entre GATA-1 et son inhibiteur dans les CSH stimulées avec de l'Epo (Figure 35A). Sous ces conditions, l'activité transcriptionnelle de GATA-1 est inhibée. De plus, il est connu que l'activité transcriptionnelle de GATA-1 est dépendante de son acétylation. Nous avons donc analysé l'effet du VPA sur le statut d'acétylation de GATA-1. Par la technique d'immunoprécipitation, suivie de la technique de western blot utilisant un anticorps anti-acétyl lysine pour détecter GATA-1 acétylé, les résultats montrent que GATA-1 n'est pas hyper-acétylé lorsque les cellules $CD34^+$ sont co-traitées avec de l'Epo et du VPA (Figure 35B). Ce résultat est aussi en accord avec l'absence d'activation de GATA-1 dans ces conditions.

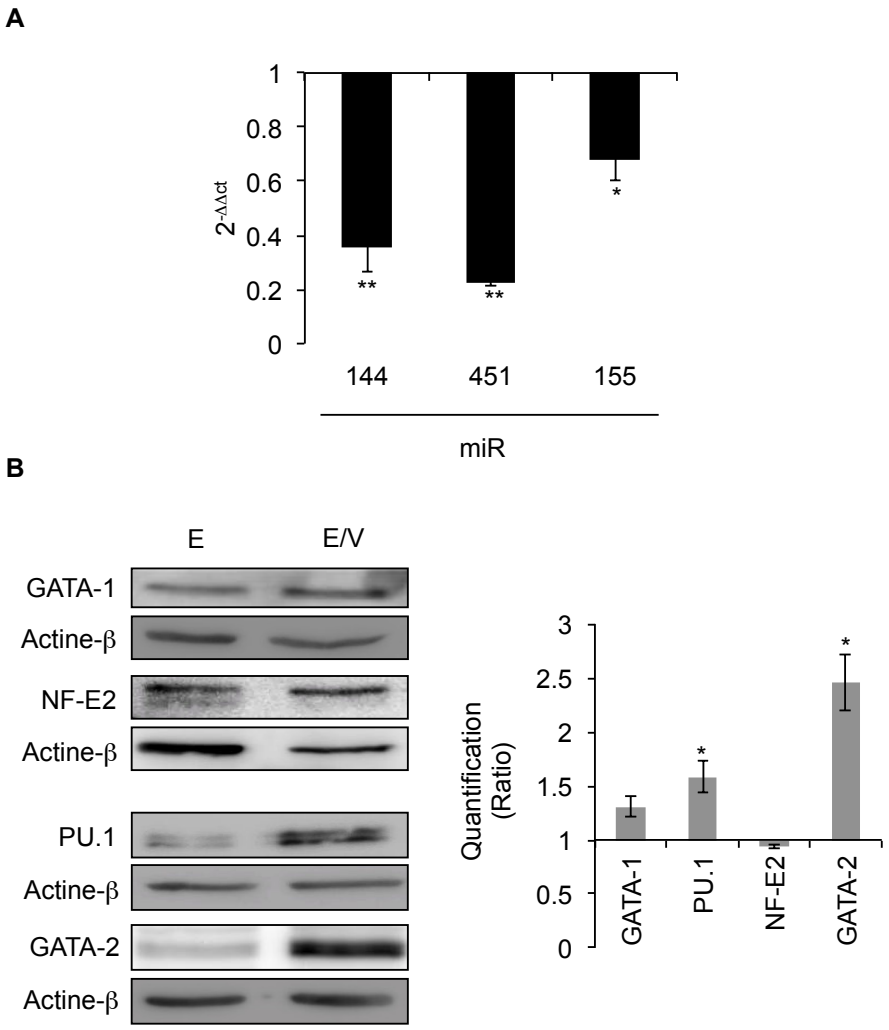


Figure 34 : Effet du VPA sur l'expression des miR et des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse dans les cellules CD34$^+$

Les CSH ont été stimulées avec de l'Epo (2 U/mL) (E) puis traitées ou non avec 1 mM de VPA (E/V) pendant 4 jours.

A. Les ARN totaux ont été extraits et analysés par PCR en temps réel pour l'expression des miR-144, 451 et 155. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène de ménage RNU1A et calculés par la méthode du ΔΔCt.

B. Les western blots ont été réalisés à partir d'extraits protéiques nucléaires. L'actine-β est utilisée comme contrôle de chargement. L'expression des différents facteurs a été quantifiée et normalisée par rapport aux cellules contrôles (E).

Les résultats correspondent à la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. **$p < 0,01$ et *$p < 0,05$.

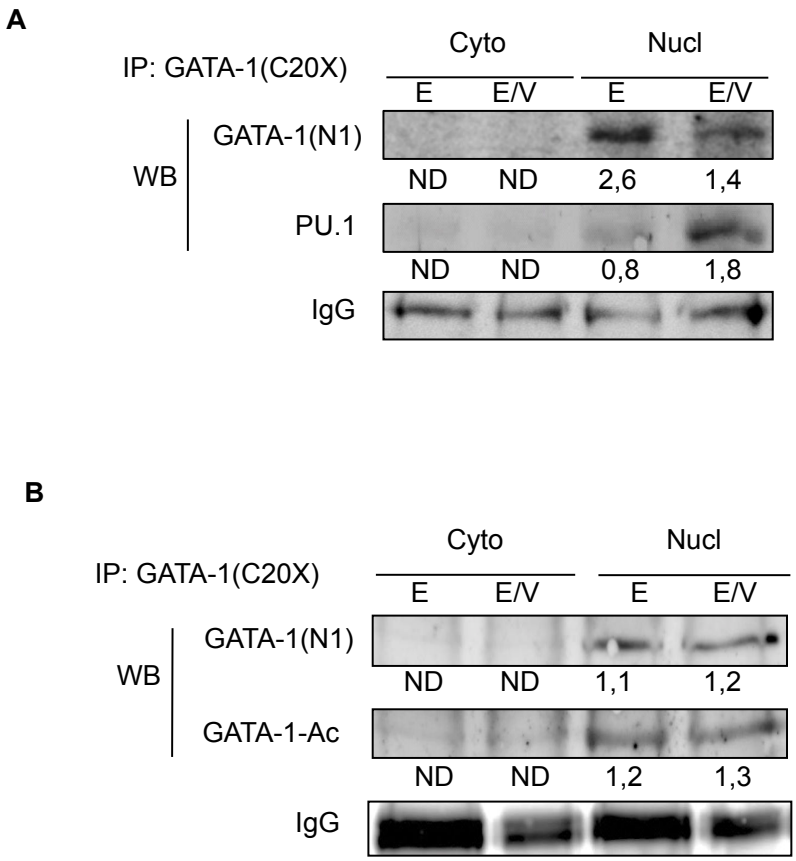


Figure 35 : L'action du VPA sur l'interaction entre GATA-1 et PU.1 et sur l'acétylation de GATA-1

Les CSH ont été stimulées avec de l'Epo (E) (2 U/mL) puis traitées ou non avec 1 mM de VPA (E/V) pendant 4 jours. La technique d'immunoprécipitation (IP) a été réalisée sur des extraits de protéines cytoplasmiques (Cyto) et nucléaires (Nucl). Pour l'IP nous avons utilisé l'anticorps anti-GATA-1 (goat-C20X).

A. L'étude de l'interaction entre GATA-1 et PU.1 a été analysée par la technique d'immunoprécipitation (IP). La révélation de GATA-1 et PU.1 par western blot a été réalisée avec des anticorps anti-GATA-1 (N1) et anti-PU.1.

B. Le statut d'acétylation de GATA-1 a été analysé par la technique d'immunoprécipitation. La révélation de GATA-1 et GATA-1 acétylé par western blot a été réalisée avec des anticorps anti-GATA-1 (N1) et anti-acétyl-lysine.

Les IgG servent de contrôle de chargement. Les expériences ont été réalisées 3 fois.

Les valeurs en dessous des western blots correspondent aux quantifications. ND : non déterminé.

En conclusion, ces résultats montrent clairement que le VPA peut moduler l'expression des miR impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse. De plus, l'utilisation des cellules $CD34^+$ nous a permis de confirmer et de corréler la diminution de l'activité transcriptionnelle de GATA-1 avec la diminution de l'expression des miR-144 et 451 spécifiquement impliqués dans la régulation de la voie de différenciation érythroïde.

4.2.4 L'inhibition du miR-451 contribue au blocage de la différenciation érythroïde induite par l'acide valproïque

Dans le but de vérifier que l'inhibition de l'expression des miR-144/451 contribue au blocage de l'érythropoïèse, nous avons spécifiquement inhibé l'expression du miR-451 dans les cellules K562 stimulées avec de l'aclacinomycine. Afin d'atteindre notre objectif, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique du miR-451 qui va inhiber l'activité du miR endogène et son expression apparente. Les cellules K562 non induites ont été transfectées avec 25, 50 ou 100 nM d'inhibiteur pendant 18h. Nous avons d'abord vérifié que la transfection n'altère pas la viabilité des cellules puis nous avons analysé l'expression du miR-451 par PCR en temps réel. Les résultats du test d'exclusion au bleu de Trypan montrent que la transfection n'a pas affecté la viabilité des cellules K562 qui est de 95,9% ; 94,3% et 94,4% lorsque les cellules sont transfectées respectivement avec 25, 50 et 100 nM d'inhibiteur (Figure 36A). Concernant l'expression du miR-451, les résultats de PCR indiquent une diminution significative, de façon concentration dépendante, de l'expression du miR-451 (Figure 36B), validant l'efficacité de la transfection de l'inhibiteur du miR-451.

Ensuite, nous avons voulu déterminer si la diminution de l'expression du miR-451 pouvait être impliquée dans l'inhibition de la différenciation érythroïde induite par le VPA. Nous avons étudié l'effet de l'inhibiteur de miR-451 sur l'induction de la différenciation érythroïde. Le test de coloration à la benzidine a été réalisé dans un premier temps sur les cellules non traitées (C), traitées avec de l'Acla (A) ou co-traitées avec de l'Acla et du VPA (A/V) pendant 72h, puis sur les cellules transfectées à blanc (T), sur les cellules transfectées à blanc et traitées avec de l'Acla (A/T) et sur les cellules transfectées avec l'inhibiteur et traitées avec de l'Acla (A/I). Les résultats montrent que le pourcentage de cellules produisant de l'hémoglobine est similaire dans les conditions A et A/T avec respectivement 52 et 57% de cellules benzidines positives (Figure 37A/B). Dans les conditions A/V, le VPA diminue le pourcentage de cellules benzidine positives en corrélation avec l'inhibition de GATA-1, avec 6,85% après 72h de traitement (Figure 37A). Concernant les cellules K562 transfectées pendant 18h avec l'inhibiteur du miR-451, puis traitées avec 10 nM d'Acla (A/I) pendant 72h, les résultats montrent que l'inhibiteur est capable d'inhiber partiellement, mais de façon significative, le pourcentage de cellules benzidine

positives (47,2 %) (Figure 37B). Ces résultats suggèrent donc que la diminution du miR-451 contribue à l'inhibition de la différenciation érythroïde induite par le VPA. La diminution partielle du pourcentage de cellules benzidine positives peut s'expliquer par le fait que dans les cellules K562 traitées avec de l'Acla, GATA-1 est surexprimé, ce qui entraîne une activation de la transcription des gènes érythro-spécifiques comme les globines. Cette activation pourrait contrebalancer l'effet de l'inhibiteur sur l'expression du miR-451.

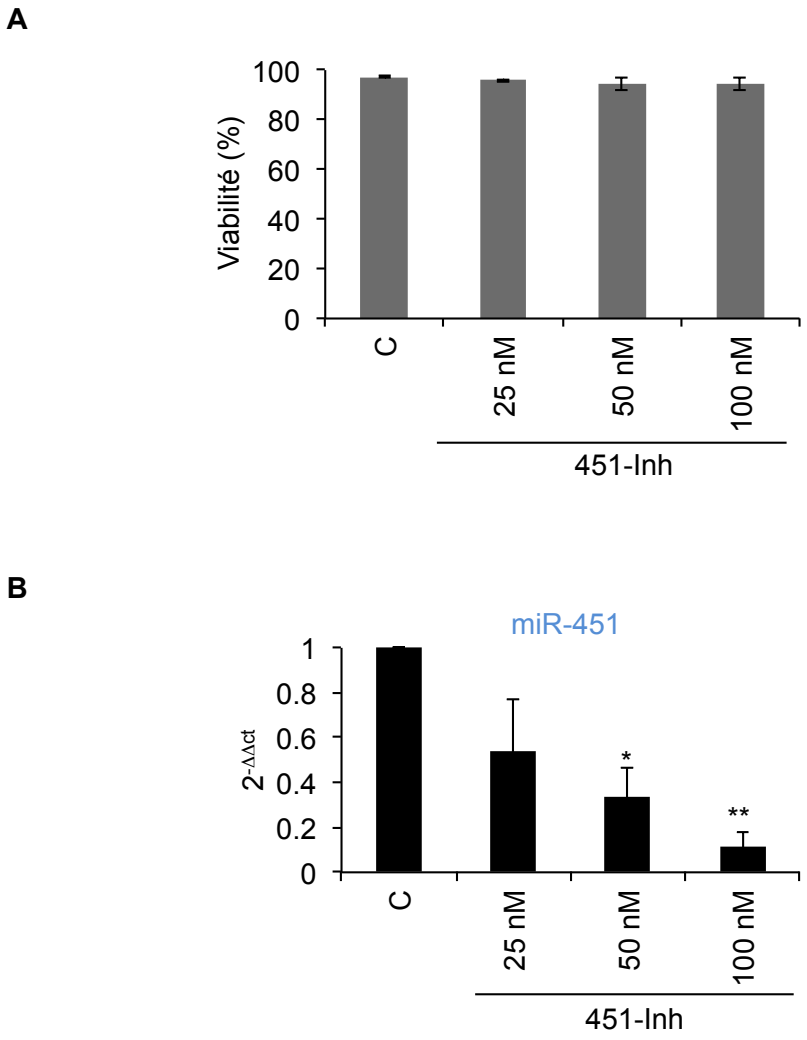


Figure 36 : Effet de l'inhibiteur du miR-451 sur la viabilité des cellules et sur l'expression apparente du miR-451 dans des cellules K562 transfectées

Les cellules K562 ont été transfectées avec 25, 50 et 100 nM d'inhibiteur de miR-451 (451-Inh) pendant 18h.

A. La viabilité cellulaire a été déterminée par coloration des cellules K562 au bleu de Trypan après transfection.

B. Les ARN totaux ont été extraits et analysés par PCR en temps réel pour l'expression du miR-451. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène de ménage RNU1A et calculés par la méthode du ΔΔCt. Les données représentent la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. **$p < 0,01$ et *$p < 0,05$.

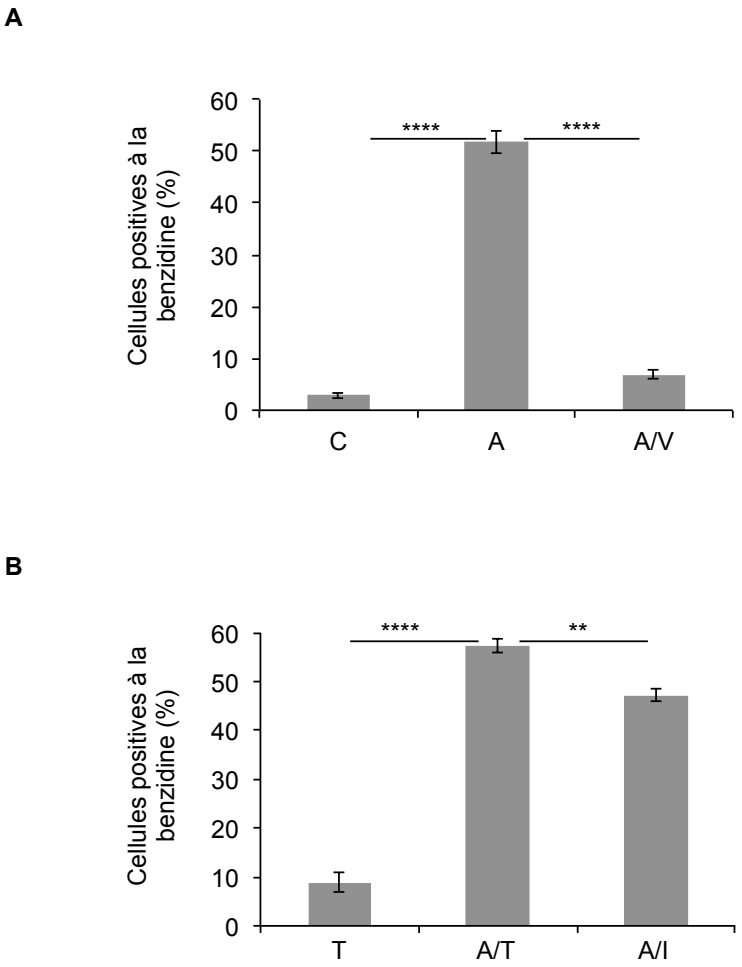


Figure 37 : Comparaison entre l'effet du VPA et l'effet de l'inhibiteur de miR-451 sur la production d'hémoglobine dans les cellules K562 induites par de l'aclacinomycine

A. L'effet du VPA sur la différenciation érythroïde a été évalué grâce à un test de coloration à la benzidine sur les cellules K562 traitées avec de l'aclacinomycine (A) et/ou 1 mM de VPA (V) pendant 72h.

B. L'effet de l'inhibiteur du miR-451 sur la différenciation érythroïde a été évalué grâce à un test de coloration à la benzidine, sur les cellules K562 transfectées avec l'inhibiteur de miR-451 pendant 18h puis traitées avec de l'Acla pendant 72h (A/I). Les tests à la benzidine ont également été réalisés sur les cellules transfectées à blanc (T) et traitées à l'aclacinomycine (A/T) pendant 72h. Les données représentent la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. ****$p < 0,0001$ et **$p < 0,01$.

Dans la littérature, il est décrit que la protéine kinase Akt, la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et l'oncoprotéine c-myc sont des cibles du miR-451 chez les mammifères. La protéine AKT peut intervenir dans la régulation de l'érythropoïèse, *via* la voie de signalisation PI3K/AKT. Nous avons étudié l'expression de ces protéines par western blot, dans les cellules K562 transfectées avec 25 et 100 nM d'inhibiteur ou dans les cellules K562 traitées avec 1 mM de VPA pendant 18h. L'analyse des western blots montre que l'inhibiteur du miR-451 induit une augmentation de l'expression des protéines Bcl-2, AKT et c-myc de manière dépendante de la concentration (Figure 38). En parallèle, les résultats montrent que le VPA induit une augmentation de l'expression de Bcl-2 et AKT, en corrélation avec l'inhibition de l'expression du miR-451 induite par le VPA. En revanche, l'expression de c-myc est diminuée lorsque les cellules sont traitées avec du VPA. Ce résultat suggère que le VPA module l'expression de c-myc de manière indépendante de l'inhibition du miR-451, mais en utilisant des mécanismes alternatifs.

En conclusion de cette partie concernant l'effet du VPA au niveau moléculaire, nous avons montré que le VPA est capable de moduler l'expression des miR et des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse. Nous avons également montré que la diminution de l'expression des miR-144/451 par le VPA est en corrélation avec la diminution de l'expression de GATA-1. De plus, la diminution de l'expression du précurseur de miR nous a également permis de conclure que le VPA agit sur l'expression des gènes des miR-144/451, au niveau transcriptionnel. L'utilisation de l'inhibiteur de miR-451, nous a révélé que l'inhibition du miR-451 par le VPA peut avoir un impact important sur l'érythropoïèse.

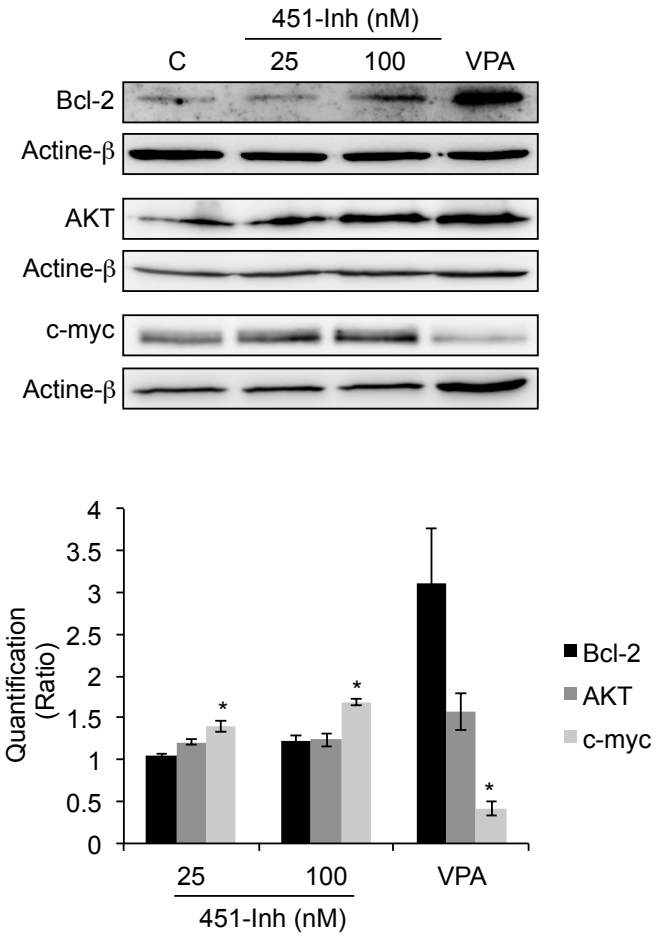


Figure 38 : Effet de l'inhibiteur du miR-451 sur l'expression de protéines décrites comme cibles du miR-451

Les cellules K562 ont été transfectées pendant 18h avec 25 et 100 nM d'inhibiteur de miR-451 (451-Inh) ou traitées avec 1 mM de VPA seul. Les western blots ont été réalisés à partir d'extraits protéiques totaux. L'actine-β est utilisée comme contrôle de chargement. Les résultats montrent une expérience représentative parmi 3. Les expressions des différentes protéines ont été quantifiées et normalisées par rapport aux cellules contrôles (C). Les données correspondent à la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. *$p < 0,05$.

4.3 Implication de l'activité inhibitrice des HDAC du VPA, dans l'inhibition de l'érythropoïèse

Le VPA étant décrit comme un inhibiteur d'HDAC, nous avons vérifié si cette activité jouait un rôle dans l'effet du VPA sur l'érythropoïèse. Le but de notre étude est d'analyser le rôle de l'activité inhibitrice des HDAC du VPA, en utilisant le valpromide (VPM), qui est un médicament antiépileptique ayant une structure chimique similaire à celle du VPA, mais qui ne possède pas d'activité inhibitrice d'HDAC et l'entinostat (MS-275), un inhibiteur d'HDAC spécifique de classe I.

4.3.1 Effet du valpromide et du MS-275 sur la viabilité et la prolifération des cellules TF1

Nous avons analysé l'effet du VPM et du MS-275 sur la viabilité des cellules TF1, par le test d'exclusion au bleu de Trypan. Environ $4x10^5$ cellules ont été traitées avec 10 U/mL d'Epo seule ou en présence de VPM (1 mM) ou de différentes concentrations de MS-275 (0,1 ; 0,5 et 1 µM) pendant 6, 24, 48 et 72h. Les résultats montrent que la viabilité après 72h de traitement par le MS-275 à 0,1 µM est de 78,4% de cellules viables, contre 24,1% et 13,7% lorsque les cellules sont traitées avec 0,5 et 1 µM de MS-275 respectivement (Figure 39). Le MS-275 sera utilisé à la concentration de 0,1 µM qui présente l'effet le moins cytotoxique. La viabilité cellulaire après un traitement de 72h par le VPM est de 83,4%. Le VPM pourra donc être utilisé à 1 mM comme son analogue le VPA afin de comparer l'effet des deux molécules dans les mêmes conditions (Figure 39). Concernant la prolifération cellulaire, les résultats obtenus montrent un effet cytostatique du VPM (1 mM) et du MS-275 (0,1 µM) après 72h de traitement (Figure 40).

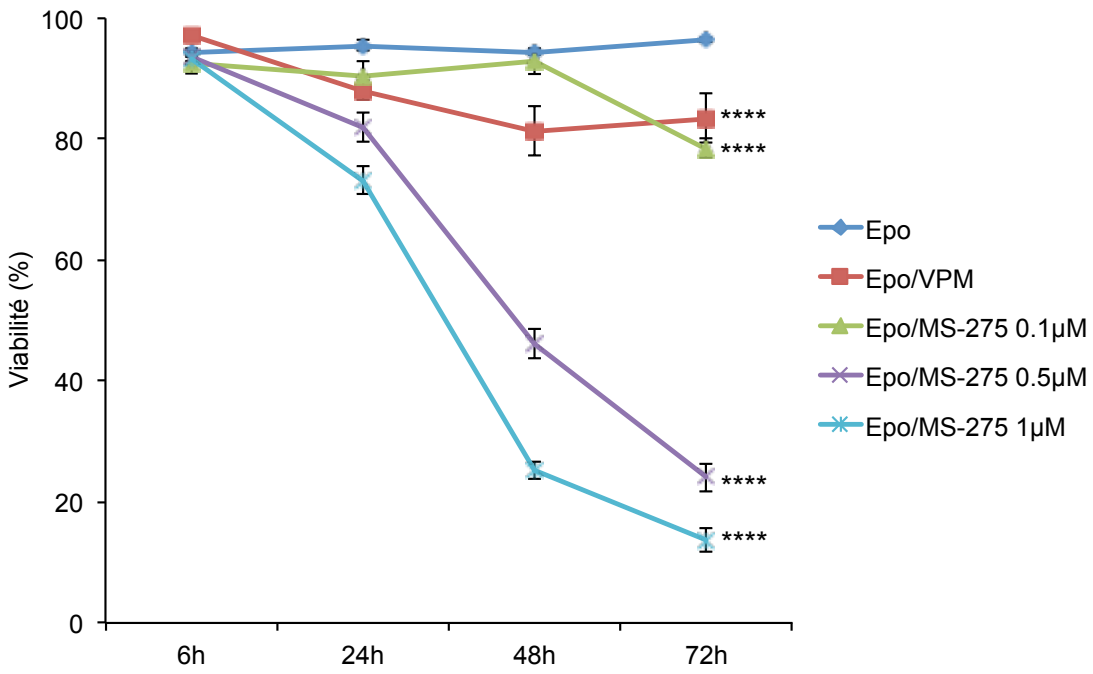


Figure 39 : Effet du Valpromide et du MS-275 sur la viabilité des cellules TF1

Les cellules TF1 ont été traitées avec 10 U/mL d'Epo seule ou co-traitées avec 1 mM de Valpromide (VPM) ou différentes concentrations de MS-275 (0,1 ; 0,5 et 1 µM). Les cellules ont été traitées pendant 6, 24, 48 et 72h. La viabilité cellulaire a été déterminée par coloration des cellules au bleu de Trypan. Les résultats représentent la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. ****$p < 0,0001$.

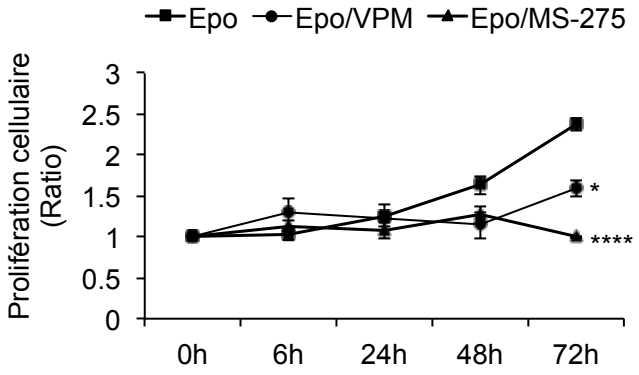


Figure 40 : Effet du VPM et du MS-275 sur la prolifération cellulaire des cellules TF1

Les cellules TF1 ont été traitées avec 10 U/mL d'Epo seule ou co-traitées avec 1 mM de valpromide (VPM) ou différentes concentrations de MS-275 pendant 6, 24, 48 et 72h. La prolifération cellulaire est exprimée sous forme d'un ratio entre le nombre de cellules viables comptées à chaque temps, sur le nombre de cellules viables comptées au temps 0h. Les courbes correspondent à la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. ****$p < 0,0001$ et *$p < 0,05$.

4.3.2 Effet de l'acide valproïque, du MS-275 et du valpromide sur l'acétylation des histones

Avant d'étudier l'effet de ces composés sur l'érythropoïèse, nous avons vérifié leur propriété inhibitrice d'HDAC, grâce à l'analyse de la modification du statut d'acétylation de l'histone H4. Les cellules TF1 ont été traitées pendant 24h avec 10U/mL d'Epo seule ou cotraitées avec 0,5 et 1 mM de VPA, 0,1 µM de MS-275, 1 mM de VPM et 1 µM de SAHA. Nous avons utilisé le SAHA comme contrôle positif car cette molécule est un puissant inhibiteur des HDAC. Les résultats montrent que le VPA utilisé à 0,5 et 1 mM, ainsi que le MS-275 et le SAHA sont capables d'augmenter de façon significative l'acétylation de l'histone H4 (Figure 41). D'une façon intéressante, le VPA utilisé à une concentration de 0,5 mM possède une activité inhibitrice d'HDAC, alors que précédemment nous avons montré que le VPA utilisé à cette concentration n'est pas capable d'inhiber l'érythropoïèse. Grâce à ce résultat, nous avons un premier élément de réponse qui montre que l'inhibition de l'érythropoïèse pourrait ne pas passer par l'activité HDAC inhibitrice du VPA.

Concernant le VPM, qui est le contrôle négatif de l'expérience, car il ne possède pas d'activité HDAC inhibitrice, les résultats de western blot ne révèlent aucune modification du statut d'acétylation de l'histone H4 (Figure 41). Ce dernier résultat semble donc en accord avec l'absence d'activité HDAC inhibitrice du VPM.

L'analyse de l'expression de l'histone H4 totale ne montre aucune variation d'expression de cette protéine lors des différents traitements réalisés.

Pour la suite de notre étude, concernant l'effet de ces molécules sur l'érythropoïèse, nous travaillerons donc avec 0,1 µM de MS-275 et 1 mM de VPM.

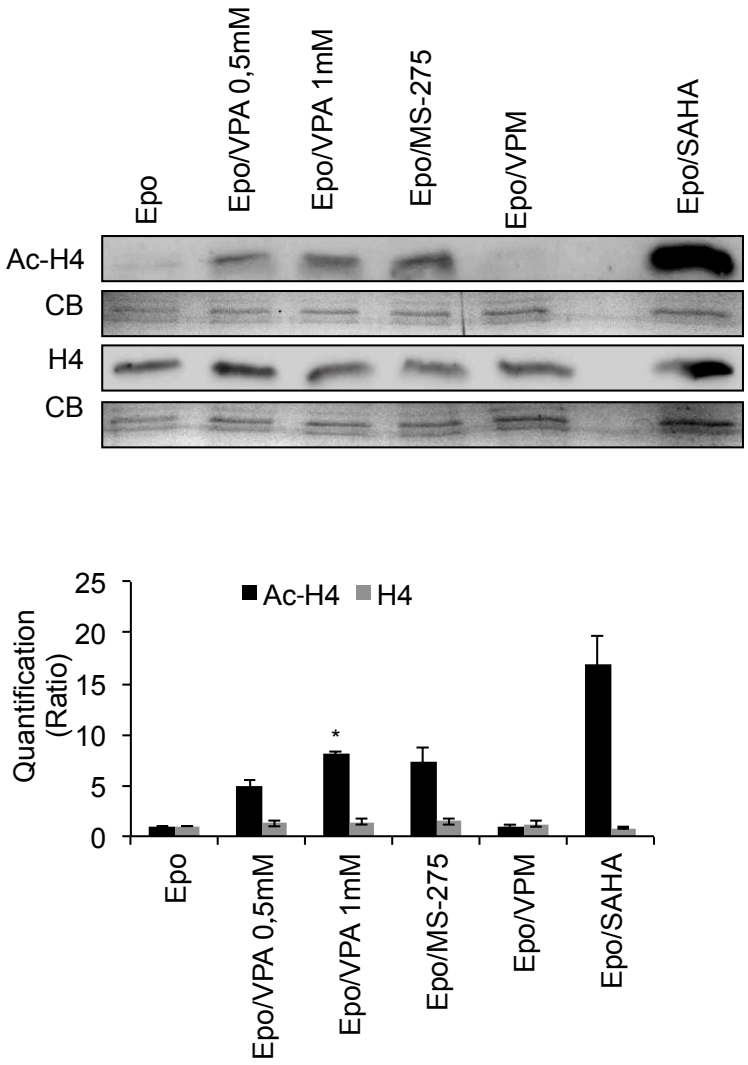


Figure 41 : Analyse du statut d'acétylation de l'histone H4 en réponse au VPA, MS-275, VPM et SAHA

Les cellules TF1 ont été traitées pendant 24h avec 10 U/mL d'Epo seule ou co-traitées avec 0,5 mM et 1 mM de VPA, 0,1 µM de MS-275, 1 mM de VPM et 1 µM de SAHA. Les protéines ont été isolées par extraction acide, puis analysées par western blot. Le bleu de Coomassie (CB) est utilisé comme contrôle de chargement. Ce western blot illustre une expérience représentative parmi 3. Le graphe correspond aux quantifications des western blots représentés sur cette figure. Les valeurs obtenues sont normalisées par rapport au contrôle (Epo). *$p < 0,05$.

4.3.3 Rôle du valpromide et du MS-275 sur l'érythropoïèse, au niveau cellulaire

Nous avons étudié l'effet du VPM et du MS-275 sur la différenciation érythroïde. Les cellules TF1 ont été traitées pendant 72h avec 10 U/mL d'Epo seule ou cotraitées avec du VPA (1 mM), du MS-275 (0,1 µM) et du VPM (1 mM). Les résultats obtenus par le test de coloration à la benzidine révèlent que le pourcentage de cellules benzidine positives est de 36,3% lorsque les cellules sont traitées avec de l'Epo, contre 7% lorsque les cellules sont traitées avec de l'Epo et du VPM (Figure 42A). Nous pouvons donc observer un effet inhibiteur du VPM sur l'érythropoïèse, qui est similaire à celui du VPA. Concernant l'effet du MS-275, le pourcentage de cellules benzidine positives reste similaire à celui obtenu dans les cellules contrôles (Epo), avec 32,6% de cellules benzidine positives. Pour compléter l'effet de ces composés sur la différenciation érythroïde, nous avons analysé par cytométrie de flux, un marqueur érythroïde spécifique, la glycophorine A (GPA). Les résultats obtenus montrent que le VPM induit une diminution de l'intensité de fluorescence moyenne (IMF) après 48h de traitement, comme dans le cas du VPA, alors que le MS-275 induit une augmentation significative de la IMF par rapport aux cellules contrôles (Epo) (Figure 42B).

L'effet inhibiteur du VPM sur la différenciation érythroïde a été confirmé dans les cellules K562 induites à se différencier avec de l'Acla et dans les cellules $CD34^+$ stimulées avec de l'Epo. Concernant la production d'hémoglobine, les résultats montrent que le VPM est capable de bloquer l'induction de la différenciation par l'Acla, puisque le pourcentage de cellules benzidine positives passe de 32,8% à 3,5% lorsque les cellules sont traitées respectivement avec de l'Acla seule (A) ou avec de l'Acla et du VPM (A/VPM) pendant 72h (Figure 43A). Dans les cellules $CD34^+$, le pourcentage de cellules benzidine positives passe de 15 à 2 % lorsque les cellules sont traitées respectivement avec de l'Epo seule ou avec de l'Epo et du VPM pendant 4 jours (Figure 43B). L'effet du VPM sur la différenciation érythroïde induite dans les $CD34^+$ a été confirmé par l'analyse par cytométrie de flux du marqueur GPA. Les résultats indiquent que le VPM diminue l'intensité moyenne de fluorescence de 50% lorsque les cellules sont traitées pendant 4 jours avec 1 mM de VPM (Figure 44A). De plus, l'analyse de la viabilité des cellules $CD34^+$ après 4 jours de traitement

permet d'affirmer que l'effet du VPM sur la différenciation des cellules, n'est pas dû à un effet du VPM sur la viabilité des cellules. Les résultats montrent qu'après 4 jours de traitement, la viabilité est de 90% lorsque les cellules sont traitées avec de l'Epo seule, contre 72% lorsque les cellules sont co-traitées avec de l'Epo et 1 mM de VPM (Figure 44B).

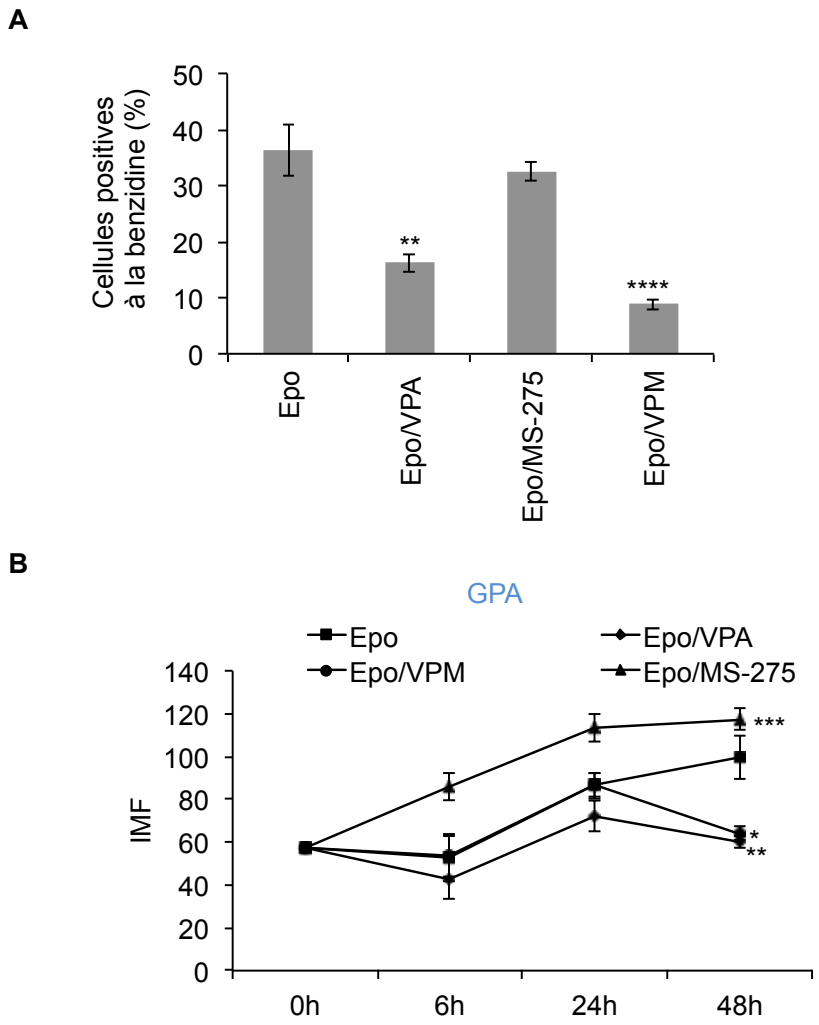


Figure 42 : Etude de l'effet du VPM et du MS-275 sur la différenciation érythroïde en comparaison avec l'effet du VPA

Les cellules TF1 ont été traitées avec de l'Epo (10 U/mL) seule ou co-traitées selon les conditions suivantes : Epo/VPA, Epo/MS-275 et Epo/VPM pendant 6, 24, 48 ou 72h.

A. L'effet du VPM et du MS-275 sur la différenciation érythroïde a été évalué grâce au test de coloration à la benzidine, après 72h de traitement.

B. Evaluation par cytométrie de flux du marqueur érythroïde, glycophorine A (GPA). Les courbes représentent l'intensité moyenne de fluorescence en fonction du temps de traitement. Les résultats correspondent à la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. ****$p < 0,0001$, ***$p < 0,001$, **$p < 0,01$ et *$p < 0,05$.

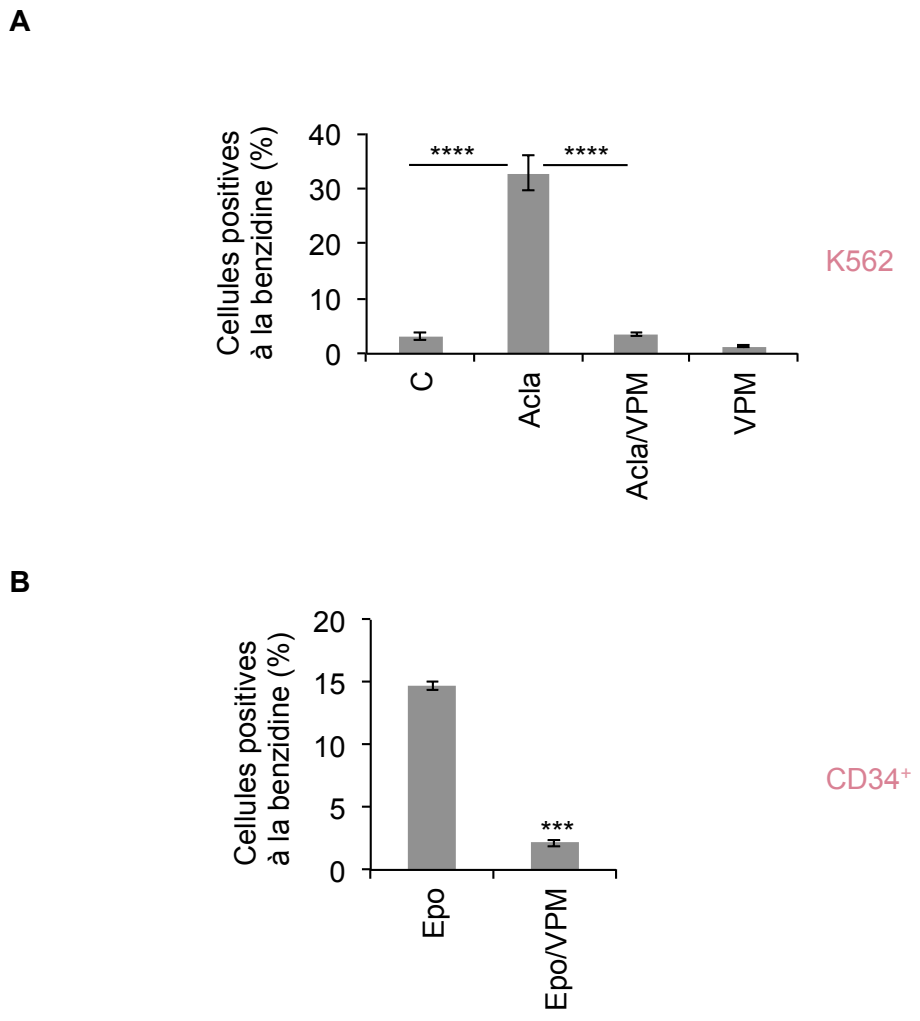


Figure 43 : Effet du VPM sur la différenciation érythroïde des cellules K562 induites avec de l'aclacinomycine et des CD34$^+$ induites avec de l'Epo

L'effet du VPM sur la différenciation érythroïde a été analysé après 72h de traitement, par le test de coloration à la benzidine qui met en évidence les cellules produisant de l'hémoglobine.

A. Les cellules K562 ont été induites à se différencier vers la voie érythroïde avec de l'aclacinomycine (Acla) et co-traitées avec 1 mM de VPM pendant 72h.

B. Les cellules CD34$^+$ ont été induites à se différencier vers la voie érythroïde avec de l'Epo et co-traitées avec 1 mM de VPM pendant 4 jours.

Les résultats correspondent à la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. ****$p < 0,0001$, ***$p < 0,001$, **$p < 0,01$ et *$p < 0,05$.

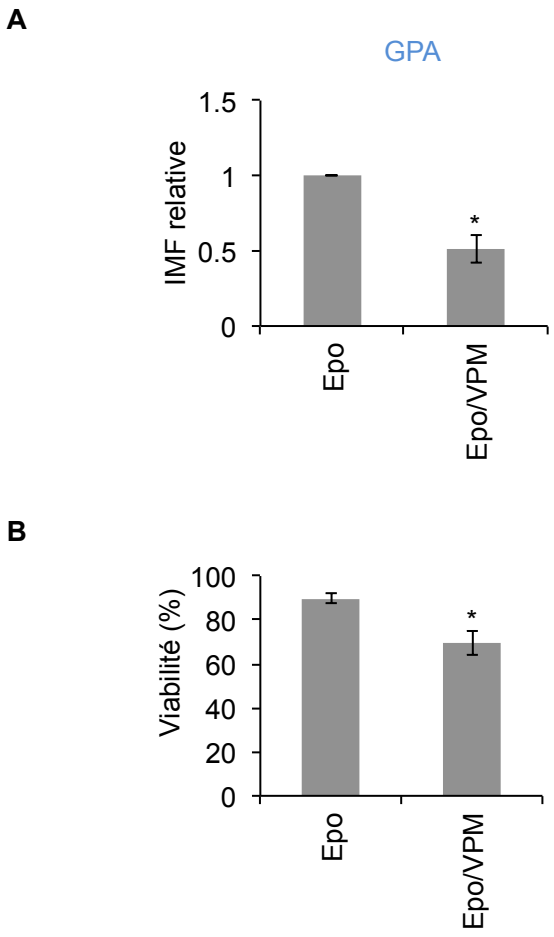


Figure 44 : Effet du VPM sur la différenciation érythroïde et sur la viabilité des cellules CD34$^+$

Les cellules CD34$^+$ ont été traitées avec 2 U/mL d'Epo seule ou co-traitées avec de l'Epo et 1 mM de VPM pendant 4 jours.

A. Evaluation par cytométrie de flux du marqueur érythroïde : glycophorine A (GPA). Les histogrammes correspondent à la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes et les valeurs présentées sont égales au rapport de l'IMF des cellules traitées au VPM sur l'IMF des cellules contrôles (Epo).

B. La viabilité cellulaire a été déterminée par coloration des cellules au bleu de Trypan. Les résultats correspondent représentent la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. *$p < 0,05$.

En conclusion, le VPM exerce le même effet inhibiteur que le VPA sur la différenciation érythroïde des cellules TF1, K562 et $CD34^+$ induites à se différencier vers cette voie avec différents inducteurs. De plus, nous avons montré que cet effet sur la différenciation est indépendant de la mort cellulaire. Etant donné les propriétés du VPM, il semblerait que l'activité HDAC inhibitrice du VPA n'intervienne pas dans l'inhibition de cette voie de différenciation. En ce qui concerne l'effet du MS-275 sur l'érythropoïèse au niveau cellulaire, les résultats de cytométrie de flux et de coloration à la benzidine ont confirmé un effet inducteur de la différenciation érythroïde dans les cellules TF1. Les résultats obtenus, opposés à ceux du VPA, permettent donc de suggérer que l'activité HDAC inhibitrice de classe I n'est pas nécessaire pour l'inhibition de la différenciation érythroïde.

4.3.4 Effet du valpromide et du MS-275 sur l'érythropoïèse, au niveau moléculaire

Nous avons débuté l'analyse de l'effet du VPM et du MS-275 sur la différenciation érythroïde au niveau moléculaire, par l'analyse de l'expression du facteur de transcription GATA-1 et de la γ-globine. Les cellules TF1 ont été stimulées avec de l'Epo et traitées avec 1 mM de VPA, 1 mM de VPM ou 0,1 µM de MS-275 pendant 48h. Les résultats obtenus par western blot indiquent que le VPA et le VPM sont capables d'inhiber partiellement ou totalement l'expression de la γ-globine, alors que le MS-275 ne présente pas d'effet sur l'expression de cette protéine. L'expression de GATA-1 est inhibée par le VPM de la même façon qu'avec le VPA (résultat décrit précédemment), par contre son expression est augmentée de 1,8 fois lorsque les cellules sont traitées avec du MS-275 (Figure 45). Nous avons complété cette étude sur le plan moléculaire, par l'analyse de l'expression des miR-144/451 dans les cellules TF1.

Les résultats précédents ont été confirmés, puisque le VPM est capable de réduire respectivement de 3 et 7,7 fois l'expression des miR-144 et 451, en accord avec la diminution de l'expression de GATA-1. Au contraire, le MS-275 augmente l'expression de 1,2 et 1,3 fois de ces miR en accord avec l'augmentation de l'expression de GATA-1 (Figure 46).

De plus, l'analyse de l'expression de GATA-1 et des miR-144 et 451 a été réalisée dans les cellules K562 induites avec l'Acla et traitées par le VPM. Les résultats de western blot montrent que le VPM prévient l'augmentation de l'expression de GATA-1 par l'Acla (Figure 47) et ceci en corrélation avec l'inhibition des miR observée par PCR en temps réel (Figure 48).

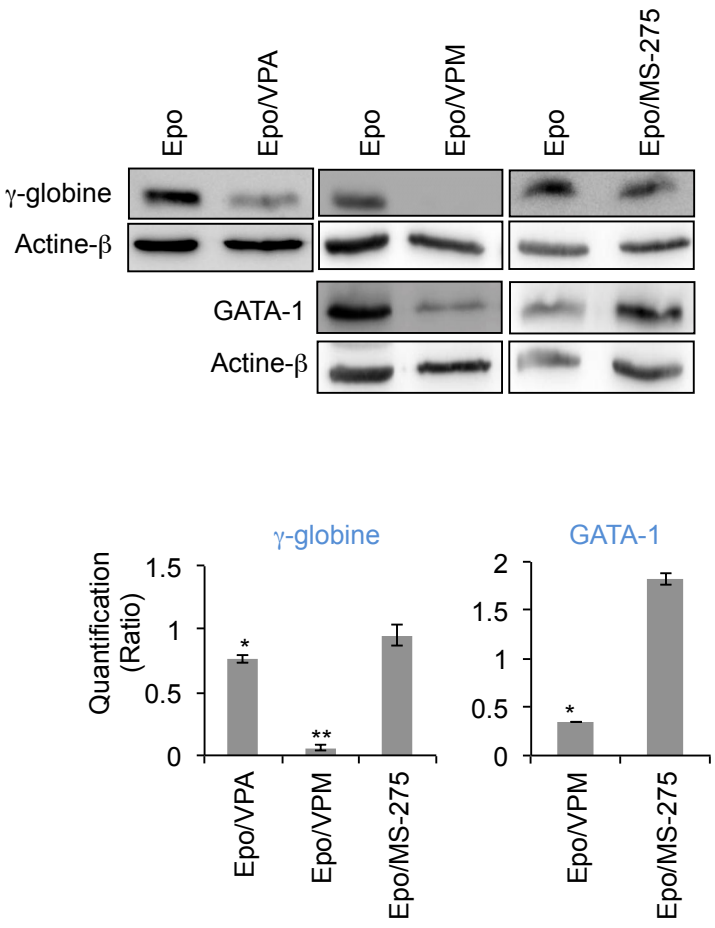


Figure 45 : Expression du facteur de transcription GATA-1 et de la γ-globine dans les cellules TF1 traitées avec du VPA, du VPM ou du MS-275

Les cellules TF1 ont été traitées avec de l'Epo (10 U/mL) seule ou co-traitées selon les conditions suivantes : Epo/VPA, Epo/MS-275 et Epo/VPM pendant 48h.

Les western blots ont été réalisés à partir d'extraits protéiques cytoplasmiques et nucléaires. L'actine-β est utilisée comme contrôle de chargement. Les différents western blots représentent chacun une expérience représentative parmi 3. Les graphes en dessous du western blot correspondent aux quantifications de la γ-globine et de GATA-1. Les valeurs obtenues sont normalisées par rapport au contrôle (Epo). $^{**}p < 0{,}01$ et $^{*}p < 0{,}05$.

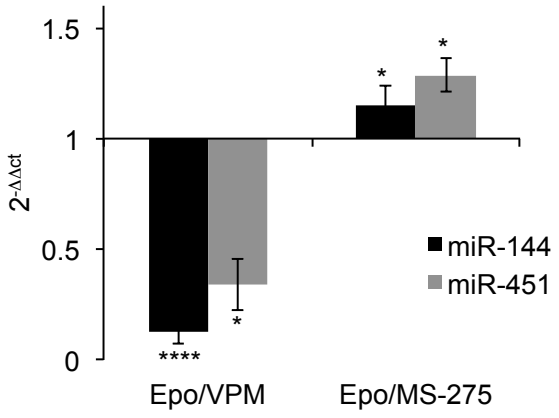


Figure 46 : Analyse de l'expression des miR-144 et 451 dans les cellules TF1 traitées avec du VPM et du MS-275

Les cellules TF1 ont été traitées avec de l'Epo (10 U/mL) seule ou co-traitées selon les conditions suivantes : Epo/MS-275 et Epo/VPM pendant 48h.
Les ARN 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 au gène de ménage RNU1A et calculés par la méthode du ΔΔCt.
Les données des histogrammes représentent la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. ****$p < 0,0001$ et *$p < 0,05$.

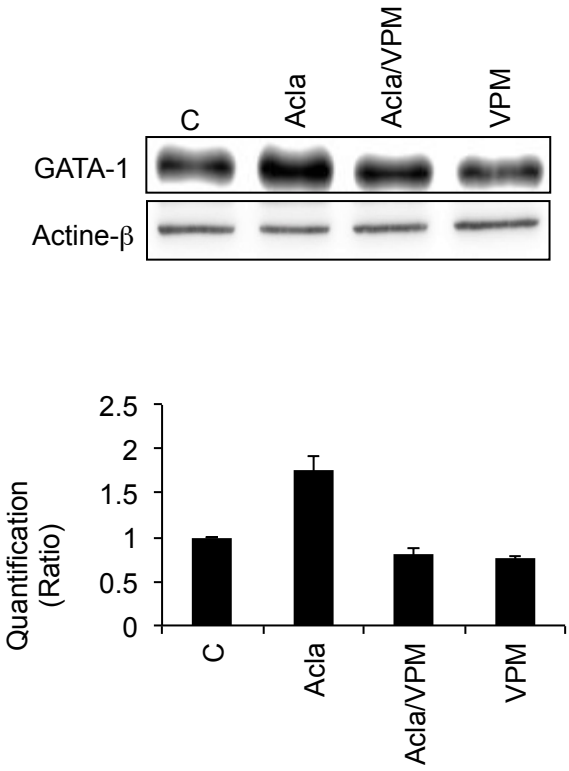


Figure 47 : Effet du VPM sur l'expression du facteur de transcription GATA-1 dans les cellules K562 induites avec de l'aclacinomycine

Les cellules K562 ont été induites à se différencier vers la voie érythroïde avec 10 nM d'aclacinomycine (Acla) et co-traitées avec 1 mM de VPM pendant 72h.
L'expression de GATA-1 a été analysée par western blot à partir d'extraits nucléaires. L'actine-β est utilisée comme contrôle de chargement. Le western bot représente une expérience parmi 3. Les graphes en dessous du western blot correspondent aux quantifications de GATA-1. Les valeurs obtenues sont normalisées par rapport au contrôle (C). Les résultats représentent la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes.

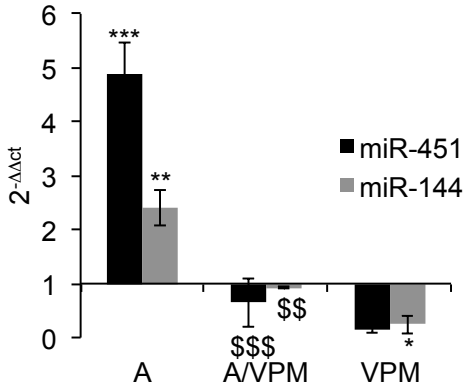


Figure 48 : Effet du VPM sur l'expression des miR-144 et 451 dans les cellules K562 induites avec de l'aclacinomycine

Les cellules K562 ont été induites à se différencier vers la voie érythroïde avec 10 nM d'aclacinomycine et co-traitées avec 1 mM de VPM pendant 72h. Les ARN 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 au gène de ménage RNU1A et calculés par la méthode du ΔΔCt. Les données des graphes représentent la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. ***$p < 0,001$, **$p < 0,01$ et *$p < 0,05$. Les $ correspondent aux tests ANOVA réalisés par rapport aux valeurs obtenues avec l'Acla. $$$$p < 0,001$ et $$$p < 0,01$.

En conclusion, le VPM est capable d'inhiber la différenciation érythroïde au niveau cellulaire et cet effet inhibiteur est confirmé au niveau moléculaire, avec une diminution de l'expression de GATA-1 et de la γ-globine ainsi que des miR-144 et 451, impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse. L'effet du MS-275 s'oppose à celui du VPM sur de la différenciation érythroïde, avec une induction de cette voie au niveau cellulaire et une augmentation de l'expression des miR et des facteurs impliqués dans la régulation de cette voie. Ces résultats, nous permettent de conclure que l'effet inhibiteur du VPA sur la voie de différenciation érythroïde est indépendant de son activité HDACi.

4.4 Effet de l'acide valproïque sur la mégacaryopoïèse

Comme les érythrocytes et les mégacaryocytes dérivent d'un progéniteur hématopoïétique commun et qu'ils partagent de nombreux facteurs de régulation, nous avons analysé l'effet du VPA sur la différenciation mégacaryocytaire. Nous allons étudier l'effet du VPA au niveau cellulaire et au niveau moléculaire dans les cellules Meg-01 stimulées ou non avec un ester de phorbol, le TPA (12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate), qui induit l'engagement des cellules dans cette voie de différenciation.

4.4.1 Analyse de l'acide valproïque au niveau cellulaire, sur la différenciation mégacaryocytaire des cellules Meg-01

Afin d'étudier l'effet du VPA sur la différenciation mégacaryocytaire, nous avons utilisé la lignée mégacaryoblastique Meg-01. Au niveau cellulaire, nous avons observé l'effet du VPA sur la morphologie cellulaire par des colorations de May-Grünwald Giemsa (MGG). Les colorations sont réalisées sur ces cellules après 3 jours de traitement avec 1 mM de VPA, 100 nM de TPA ou après un co-traitement TPA/VPA. Le TPA permet l'induction de la différenciation mégacaryocytaire et est utilisé comme contrôle positif. Après 3 jours de traitement, nous pouvons observer dans notre système *in vitro*, la formation de cellules semblables à des mégacaryoblastes (flèches noires) et à des mégacaryocytes basophiles (flèches rouges) (Figure 49). En effet, nous pouvons constater une augmentation importante de la taille des cellules et de leur noyau qui devient polylobé, lorsque les cellules sont traitées avec du VPA et/ou du TPA. Nous pouvons également observer la formation d'excroissances cytoplasmiques, dont la fragmentation donne normalement naissance aux plaquettes sanguines. Les cellules différenciées ont été comptées et le résultat montre que le TPA et le VPA induisent 32,5% et 23% de cellules différenciées respectivement par rapport au contrôle (environ 2%). De plus, nous pouvons remarquer que le VPA ne bloque pas l'induction de la voie mégacaryocytaire induite par le TPA, puisque lorsque les cellules sont traitées avec du TPA et du VPA le pourcentage de cellules différenciées est de 42%.

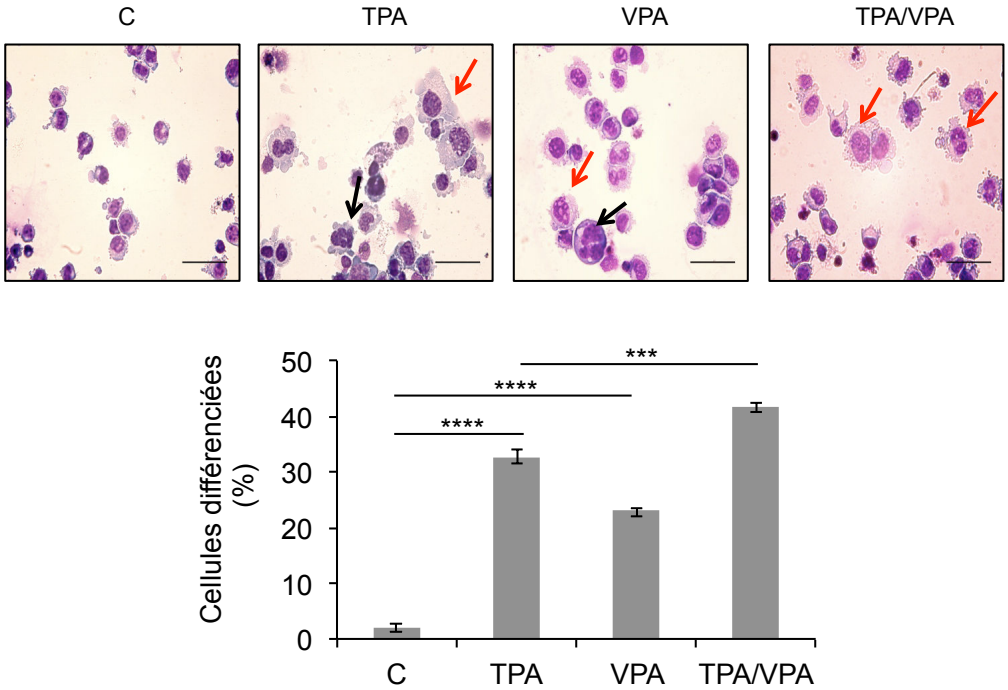


Figure 49 : Effet du VPA sur la morphologie des cellules Meg-01

Les cellules Meg-01 ont été traitées ou non (C) avec 100 nM de TPA, 1 mM de VPA ou co-traitées avec du TPA et du VPA (TPA/VPA). Les colorations MGG ont été effectuées après 3 jours de traitement. Les flèches rouges indiquent des mégacaryocytes basophiles et les flèches noires indiquent les mégacaryoblastes. Les photos ont été prises au microscope optique, objectif X20. L'échelle (barre horizontale) correspond à 50 µM. Le pourcentage de cellules différenciées a été évalué par comptage des cellules présentant une morphologie correspondant à un stade de différenciation mégacaryocytaire, au sein des cellules traitées par rapport aux cellules non traitées (C). Les résultats représentent la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. ****$p < 0,0001$ et ***$p < 0,001$.

L'induction de la différenciation par le VPA et le TPA a été confirmée par l'analyse du marqueur mégacaryocytaire CD61 par cytométrie de flux. Les résultats obtenus après 72h montre que le VPA induit une augmentation de 1,7 fois l'intensité moyenne de fluorescence (IMF), comparée à la IMF des cellules contrôles (non traitées). Concernant les cellules traitées avec du TPA, les résultats indiquent une augmentation de 2,9 fois de l'IMF (Figure 50).

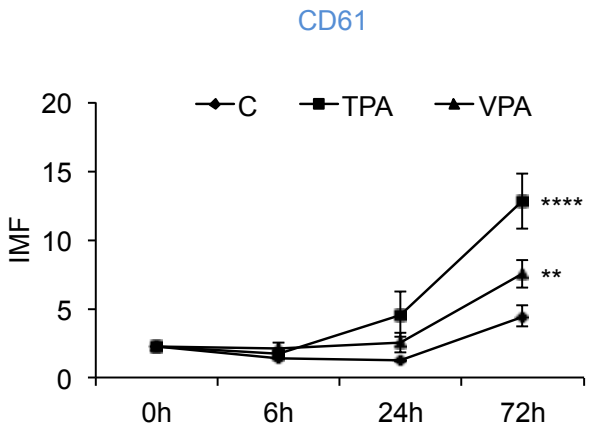


Figure 50 : Analyse par cytométrie de flux du marqueur mégacaryocytaire CD61 dans les cellules Meg-01

Les cellules Meg-01 ont été traitées ou non (C) avec 100 nM de TPA, 1 mM de VPA ou co-traitées avec du TPA et du VPA (TPA/VPA).
Le marqueur mégacaryocytaire CD61 a été analysé par cytométrie de flux. Les courbes correspondent à l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) en fonction de la durée du traitement. Les résultats représentent la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. ****$p < 0,0001$ et **$p < 0,01$.

L'effet du VPA et du TPA a été analysé sur la viabilité et la prolifération des cellules Meg-01. Les cellules ont été traitées pendant 0, 6, 24 et 72h avec 1 mM de VPA ou avec 100 nM de TPA. Le test d'exclusion au bleu de Trypan a révélé un effet du VPA et du TPA significatif, mais faible, sur la viabilité des cellules avec un pourcentage de viabilité d'environ 80% à 72h de traitement (Figure 51A). Les résultats indiquent que le VPA a un effet cytostatique à 72h de traitement, puisque les cellules traitées ont une croissance ralentie comparée aux cellules non traitées (C) (Figure 51B). L'arrêt de la prolifération cellulaire est donc en accord avec l'induction de la différenciation mégacaryocytaire par le VPA.

Ces résultats montrent que contrairement à la voie érythroïde, le VPA n'inhibe pas la différenciation mégacaryocytaire. Les résultats de MGG et de cytométrie de flux indiquent que le VPA est plutôt capable d'induire cette voie de différenciation. En conclusion, l'effet inhibiteur du VPA sur la différenciation érythroïde ne correspond pas un effet général sur l'hématopoïèse.

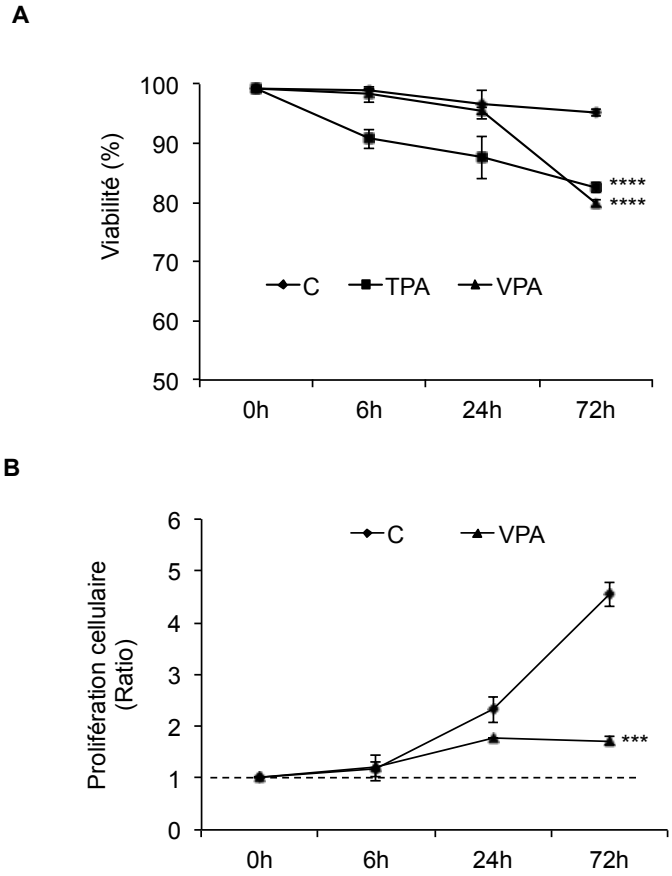


Figure 51 : Effet du VPA sur la viabilité et la prolifération cellulaire des cellules Meg-01

Les cellules Meg-01 ont été traitées avec 1 mM de VPA ou avec 100nM de TPA pendant 0, 6, 24 et 72h.

A. La viabilité cellulaire a été déterminée par le test d'exclusion au bleu de Trypan.

B. La prolifération cellulaire est exprimée sous forme d'un ratio entre le nombre de cellules viables comptées à chaque temps, sur le nombre de cellules viables comptées au temps 0h.

Les courbes correspondent à la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. ****$p < 0,0001$, ***$p < 0,001$.

4.4.2 Analyse de l'effet de l'acide valproïque au niveau moléculaire, sur la différenciation mégacaryocytaire des cellules Meg-01

Après avoir montré que le VPA est capable d'induire la différenciation mégacaryocytaire au niveau cellulaire, nous avons analysé son effet au niveau moléculaire. Compte tenu des points de convergences entre l'érythropoïèse et la mégacaryopoïèse concernant les facteurs de régulation, nous nous sommes intéressés à l'effet du VPA sur les miR étudiés dans les modèles érythroïdes précédents.

Les cellules Meg-01 ont été traitées pendant 6, 24 et 72h avec 1 mM de VPA. Comme pour les cellules TF1 et K562, les résultats de PCR en temps réel montrent que l'expression des miR-144 et 451 diminue de façon significative lorsque les cellules sont traitées avec du VPA (Figure 52). L'expression du miR-27a, qui est impliquée positivement dans la voie de la mégacaryopoïèse, augmente de 3 fois dès 6h de traitement avec le VPA. Son niveau d'expression diminue cependant progressivement aux temps 24 et 72h. Concernant l'expression des miR-221 et 222, leur expression reste inchangée lors du traitement au VPA.

Pour compléter cette étude au niveau moléculaire, nous avons analysé l'effet du VPA sur l'expression de certains facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la mégacaryopoïèse. Nous avons observé par western blot (Figure 53B), que le VPA est capable de diminuer l'expression du facteur GATA-1 dans les cellules Meg-01 en accord avec la diminution de l'expression des miR-144 et 451. Au contraire, l'expression de GATA-2 est augmentée, en accord avec l'induction de la mégacaryopoïèse, puisque ce facteur est nécessaire pour l'orientation des CSH dans cette voie. D'autre part, nous avons analysé par PCR en temps réel l'effet du VPA sur l'expression de l'ARNm du facteur de transcription RUNX1, impliqué dans la régulation de la mégacaryopoïèse. Les résultats montrent une diminution de l'expression de l'ARNm de RUNX1 dès 6h de traitement au VPA, en accord avec l'activation de la mégacaryopoïèse et l'augmentation du miR-27a (Figure 53A).

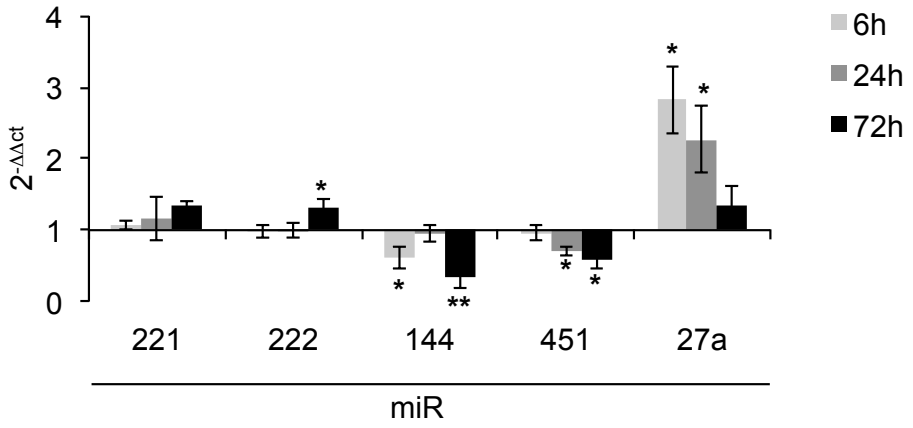


Figure 52 : Effet du VPA sur l'expression des miR impliqués dans la régulation de la mégacaryopoïèse

Les cellules Meg-01 ont été traitées avec 1 mM de VPA pendant 6, 24 et 72h. Les ARN totaux ont été extraits et analysés par PCR en temps réel pour l'expression des miR-221, 222, 144, 451 et 27a. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène de ménage RNU1A et calculés par la méthode du ΔΔCt. Les résultats représentent la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. **$p < 0,01$ et *$p < 0,05$.

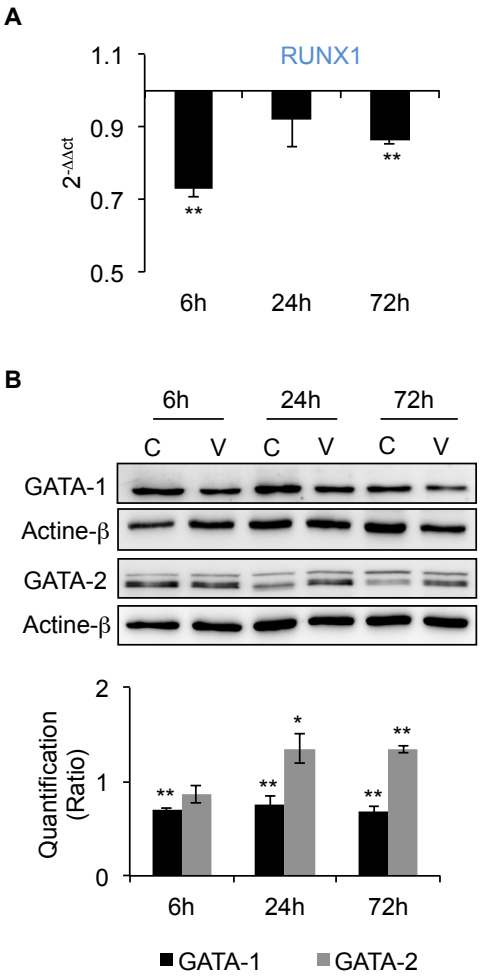


Figure 53 : Effet du VPA sur l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la mégacaryopoïèse

Les cellules Meg-01 ont été traitées avec 1 mM de VPA pendant 6, 24 et 72h.

A. Les ARN totaux ont été extraits et analysés par PCR en temps réel pour l'expression de l'ARNm de RUNX1. Les résultats ont été normalisés par rapport au gène de ménage actine-β et calculés par la méthode du ΔΔCt.

B. L'expression de GATA-1 et GATA-2 a été analysée par western blot à partir d'extraits nucléaires. L'actine-β est utilisée comme contrôle de chargement. Les western blots représentent chacun une expérience parmi 3. Le graphe sous le western blot correspond aux quantifications de GATA-1 et GATA-2. Les valeurs obtenues sont normalisées par rapport au contrôle (C).

Les valeurs des quantifications représentent la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. **$p < 0,01$ et *$p < 0,05$.

L'ensemble des résultats montre que le VPA est capable d'inhiber la différenciation érythroïde et d'induire la différenciation mégacaryocytaire. Nous nous sommes donc intéressés à la capacité du VPA de provoquer une transition entre la voie érythroïde qui est inhibée et la voie mégacaryocytaire qui est induite, en modulant l'expression de facteurs de transcription impliqués dans les deux voies mais de manière contradictoire. Ainsi, outre le facteur PU.1 déjà étudié plus haut, les facteurs de la famille ETS, ETS-1, Fli-1 et GABP-α, qui favorisent la voie mégacaryocytaire tout en inhibant la voie érythroïde ont été analysés. Nous avons traité les cellules $CD34^+$ avec 10 U/mL d'Epo et 1 mM de VPA pendant 4 jours et nous avons analysé l'expression de ces facteurs de transcription. De façon intéressante, l'expression des trois facteurs de transcription est clairement et significativement augmentée, ce qui est en accord avec l'activation potentielle du développement mégacaryocytaire. En revanche, les résultats de western blot indiquent que l'expression du facteur de transcription RUNX1 n'est pas modifiée dans ces conditions (Figure 54).

En conclusion, les résultats montrent l'effet spécifique du VPA sur les miR et les facteurs de transcription impliqués dans la mégacaryopoïèse. La diminution de l'expression de GATA-1 et des miR-144/451 n'entraîne pas d'inhibition de la voie mégacaryocytaire et semble donc être plus spécifiques de la voie érythroïde. L'augmentation de l'expression de GATA-2 est en accord avec l'induction de la voie mégacaryocytaire. L'induction de l'expression du miR-27a est en lien avec la diminution de l'expression de l'ARNm du facteur de transcription RUNX1.
De plus, l'utilisation des CSH induites avec de l'Epo et traitées avec du VPA a permis de mettre en évidence que le VPA module l'expression de facteurs de transcription communs aux voies de différenciation érythroïde et mégacaryocytaire, notamment les facteurs de la famille ETS et de la famille GATA.

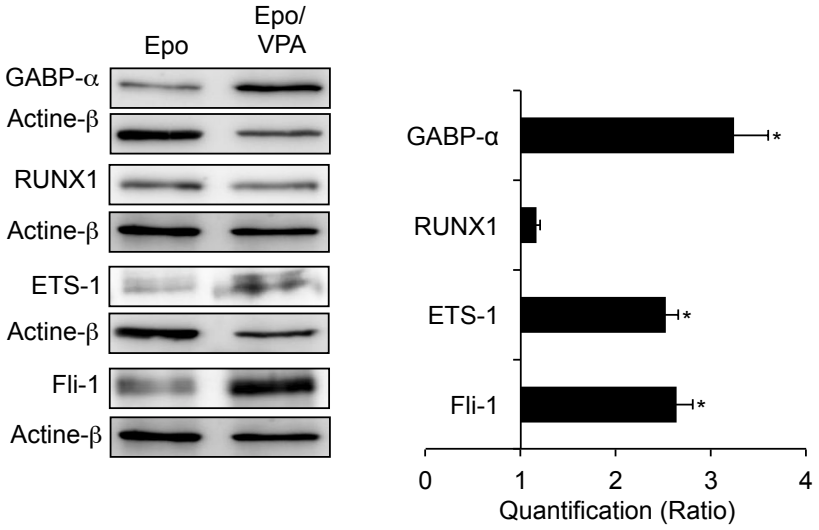


Figure 54 : Expression des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la mégacaryopoïèse dans les cellules CD34$^+$

Les cellules CD34$^+$ ont été stimulées avec de l'Epo et traitées ou non avec 1 mM de VPA pendant 4 jours.

L'expression des différents facteurs de transcription a été analysée par western blot à partir d'extraits protéiques nucléaires. L'actine-β est utilisée comme contrôle de chargement. Les western blots correspondent chacun à une expérience représentative parmi 3. Le graphe à côté du western blot correspond aux quantifications des différents western blots. Les valeurs obtenues sont normalisées par rapport au contrôle (C).

Les valeurs des quantifications représentent la moyenne ± la déviation standard à la moyenne de 3 expériences indépendantes. **$p < 0,01$ et *$p < 0,05$.

5 Discussion

Le VPA est utilisé depuis 1967 comme médicament antiépileptique et psychotrope. Plus récemment, il a été décrit comme un inhibiteur des histones désacétylases (HDAC), conférant à cette molécule un intérêt en thérapie anti-cancéreuse. Son utilisation en neuropsychiatrie a permis d'obtenir de nombreuses données cliniques concernant ses effets secondaires (Chateauvieux et al. 2010). Notamment, le rôle du VPA dans les troubles hématologiques est en corrélation avec sa toxicité directe sur la moelle osseuse, entraînant ainsi des thrombocytopénies, des dysfonctionnements plaquettaires, des anémies aplasiques, des coagulopathies, des hypofibrinogénémies, des déficiences du facteur XIII de coagulation et la maladie de Von Willebrand. Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont démontré la capacité du VPA de bloquer le processus de différenciation érythrocytaire, induit par des agents différenciants dans les cellules leucémiques (Chateauvieux et al. 2011). Basé sur ces résultats, nous démontrons ici que le VPA, qui possède une activité inhibitrice des HDAC principalement de classe I (Gottlicher 2004; Gurvich et al. 2004), est capable de moduler la différenciation érythroïde, tout en favorisant les caractéristiques mégacaryocytaires. Cette modulation passe par la modification de l'expression des facteurs de transcription et de miR impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse, mais se révèle étrangère à l'activité inhibitrice des HDAC.

5.1 Choix des modèles cellulaires

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont des cellules indifférenciées portant le marqueur CD34. Ce marqueur est également retrouvé au niveau des progéniteurs hématopoïétiques. Sous l'action des différentes cytokines, les CSH vont s'engager vers l'une des voies de différenciation, pour donner naissance aux différentes cellules sanguines. Il existe différentes sources de CSH : la moelle osseuse, le sang circulant et le sang de cordon ombilical. Dans notre cas, nous avons travaillé à partir de cellules du sang de cordon car il est facile à obtenir, ne présente aucun risque pour l'enfant ni la mère, et le prélèvement est sans douleur. Après l'isolement, les cellules $CD34^+$ sont mises en culture dans du milieu sans sérum, en présence d'un cocktail de cytokines et

de facteurs de croissance comme l'IL3 et le SCF, qui permettent la survie et la prolifération des cellules. Nous avons validé ce système *in vitro* afin d'étudier l'effet du VPA sur l'érythropoïèse. En effet, des travaux réalisés au laboratoire ont montré que suite à une stimulation avec de l'IL3, du SCF et de l'Epo, les cellules sont capables de reproduire les différents stades de la différenciation érythroïde (Grigorakaki et al. 2011). Ce système nous semble donc être un bon modèle expérimental qui représente toutefois une simplification de la situation *in vivo*, puisque nous ne tenons pas compte des autres facteurs de croissance et cytokines impliqués dans l'hématopoïèse. De plus, une des limites de ce modèle est l'hétérogénéité, car les cellules ne sont pas toutes au même stade de différenciation et sont donc susceptibles de répondre différemment à l'Epo. Cependant, nous avons décidé de travailler sur l'ensemble des cellules $CD34^+$, sans isoler les progéniteurs érythroïdes, afin d'observer l'effet du VPA dans des conditions les plus proches possibles de la réalité physiologique.

Les cellules TF1 sont dépendantes, pour leur survie et leur prolifération, de GM-CSF ou d'Epo. Dans nos conditions, les cellules TF1 sont maintenues en culture en présence de GM-CSF, mais stimulées avec de l'Epo dans le but d'induire la différenciation érythroïde. Il est important de noter cependant que, d'après les travaux de Liu et al., les cellules qui sont cultivées en présence de GM-CSF peuvent dans certaines conditions, générer des cellules érythroïdes (Liu et al. 2010). Le modèle TF1 est intéressant car il se rapproche de celui des cellules $CD34^+$, par l'induction de la différenciation érythroïde par l'Epo. En revanche, dans le cas des cellules TF1, l'IL3 et le SCF ne sont pas nécessaires car l'Epo est capable d'assurer leur croissance, leur survie et la différenciation érythroïde. La population cellulaire reste donc homogène, permettant ainsi d'isoler l'effet du VPA. Cependant, les cellules TF1 sont des cellules de leucémie myéloïde aiguë exprimant la protéine de fusion PML-RARα (promyleocytic leukemia-retinoic acid receptor alpha), qui entraine l'activation constitutive de la transcription de nombreux gènes pouvant modifier le développement érythroïde normal. Cette onco-protéine de fusion PML-RARα, est également impliquée dans la survie et donc dans la résistance à l'apoptose des cellules leucémiques (Rogaia et al. 1995).

Les cellules K562 sont bloquées à un stade précoce de différenciation et expriment naturellement des marqueurs érythroïdes, mégacaryocytaires et myéloïdes (Zhu et al.

2002), mais ces cellules sont majoritairement utilisées comme modèle pour la différenciation érythroïde. C'est dans ce sens que nous avons choisi d'utiliser ces cellules. Elles sont issues d'une leucémie myéloïde chronique (LMC) en phase blastique, et se caractérisent donc par une anomalie chromosomique: le chromosome de Philadelphie, qui résulte d'une translocation entre les chromosomes 9 et 22 t(9;22)(q34;q11), à l'origine de la fusion entre les gènes « breakpoint cluster region » (Bcr) et le gène Abelson (Abl). Le gène de fusion généré code pour l'oncoprotéine Bcr-Abl. De manière intéressante, les cellules K562 ne répondent pas à l'Epo bien qu'elles expriment le récepteur EpoR. Sous l'action de différents agents chimiques comme les anthracyclines, l'hémine ou certains inhibiteurs d'HDAC (apicidine, butyrate de sodium), elles peuvent se différencier vers la voie érythrocytaire en synthétisant de l'Hb. Les travaux précédemment réalisés au laboratoire avaient montré l'effet du VPA sur l'expression du facteur de transcription GATA-1, dans les cellules K562 induites à se différencier vers la voie érythroïde avec de l'aclacynomycine (Acla), de la doxorubicine (Dox), du radicicol ou de l'hémine (Chateauvieux et al. 2011). Pour notre étude, nous avons décidé d'analyser l'effet du VPA sur les cellules K562 induites avec de l'Acla, car dans ces conditions les cellules surexpriment le facteur GATA-1 (Morceau et al. 1996). Seul l'ester de phorbol TPA a été décrit comme un inducteur des marqueurs spécifiques de la différenciation mégacaryocytaire dans ces cellules.

Afin d'étudier l'effet du VPA sur la différenciation mégacaryocytaire, nous avons donc choisi une lignée mégacaryoblastique, également issue d'une LMC, la lignée Meg-01. Comme les cellules K562, ces cellules expriment de manière constitutive la protéine Bcr-Abl. Cette lignée présente toutes les caractéristiques des mégacaryocytes, notamment par la présence de l'intégrine αIIbβ3. Il nous a donc semblé plus approprié d'utiliser ces cellules plutôt que les cellules K562, pour étudier la voie de différenciation mégacaryocytaire. Ces cellules Meg-01 peuvent être induites à se différencier vers la voie mégacaryocytaire grâce au TPA.

5.2 L'acide valproïque et la différenciation

Ce travail nous a permis de montrer que le VPA module l'expression d'un panel de miR, impliqués dans la régulation des voies de différenciation érythroïde et

mégacaryocytaire (Havelange et al. 2010; Bianchi et al. 2012; Zhang et al. 2012). L'expression des miR-144 et 451 est diminuée par le VPA dans les cellules stimulées à l'Epo (les cellules TF1 et $CD34^+$), ainsi que dans les cellules indifférenciées (K562 et Meg-01). Cet effet inhibiteur du VPA est indépendant d'un effet cytotoxique. La diminution de l'expression des miR-144 et 451 est concomitante avec la diminution de l'expression du facteur de transcription GATA-1. En effet, pendant l'érythropoïèse, le facteur GATA-1 active la transcription du gène codant pour les miR-144 et 451, en prenant la place du facteur de transcription GATA-2 au niveau du promoteur (Dore et al. 2008; Li et al. 2013). Dans les cellules TF1, l'Epo induit une surexpression spectaculaire de ces miR en accord avec le niveau d'expression élevé décrit dans les cellules érythroïdes (Rasmussen et al. 2010; Bianchi et al. 2012). Lorsque les cellules sont traitées avec du GM-CSF, l'expression de ces deux miR est également augmentée par rapport aux cellules privées de cytokine au temps 0. Les résultats montrent que l'augmentation est beaucoup moins importante qu'avec l'Epo, mais toujours en corrélation avec le niveau d'expression du facteur GATA-1. Par western blot, nous avons observé une expression basale de GATA-1 lorsque les cellules sont cultivées avec du GM-CSF pendant 72h. Cette observation vient du fait que dans certaines conditions, les TF1 cultivées en présence de GM-CSF peuvent générer des cellules érythroïdes et donc induire l'expression de GATA-1. Cependant dans ces conditions, l'expression basale de GATA-1 est en lien avec l'augmentation de l'expression des miR-144 et 451, spécifiquement impliqués dans la voie de différenciation érythroïde.

Ce constat est confirmé dans les cellules K562 stimulées avec de l'Acla, puisque l'expression des miR matures 144 et 451 est augmentée en accord avec l'induction de GATA-1 (Morceau et al. 1996; Morceau et al. 1996). De plus, le VPA prévient cet effet, en corrélation avec l'inhibition de l'expression de GATA-1. De façon intéressante, l'expression du précurseur de miR (pré-miR) qui est principalement nucléaire par rapport au miR mature et qui est présent avant la phase de biogénèse, est affectée de la même manière que celle des miR matures. Ce résultat montre que le VPA agit probablement d'abord sur la transcription du gène de miR-144/451 et ceci en concordance avec l'inhibition de GATA-1. Cependant, ces résultats ne peuvent exclure la possibilité que le VPA module l'expression des miR en affectant également leur biogenèse. En effet, les miR sont exportés vers le cytoplasme sous forme de pré-miR, comportant la boucle de la structure en épingle à cheveux avant d'être clivée.

Celle-ci n'est donc pas exclusivement présente dans le noyau. De plus, l'expression des deux miR matures n'est pas affectée de la même façon lors de la cinétique effectuée sur les cellules K562 et TF1. Il a été décrit que le processus de maturation présente des différences entre les miR-144 et 451, par rapport à l'implication de la protéine Ago2 et du complexe DICER. La protéine Ago2 est essentielle pour la différenciation érythroïde, car les souris présentant une déficience de cette protéine révèlent de sévères anomalies du processus érythroïde (O'Carroll et al. 2007). Contrairement au miR-144, la maturation du miR-451 est indépendante de DICER alors que la protéine Ago2 est fortement impliquée (Cheloufi et al. 2010). Par conséquent, il était intéressant de vérifier l'effet du VPA sur certains éléments de régulation de la biogenèse, notamment la protéine Ago2. Les résultats n'ont pas révélé de modification significative dans l'expression de cette protéine après traitement des cellules par le VPA. De même, la protéine exportine 5, qui permet le passage des pré-miR dans le cytoplasme, n'est pas affectée par le traitement. Par conséquent, les résultats suggèrent que le processus de maturation des miR n'est pas modulé par le VPA, mais que le facteur GATA-1 est fortement impliqué dans l'inhibition de l'expression du gène de miR-144 et 451. Le fait que le VPA inhibe l'expression de ces miR dans les cellules K562, nous a permis de conclure que celui-ci exerce son activité inhibitrice sur l'expression de GATA-1 et des miR-144 et 451, de façon indépendante à la voie de signalisation Epo/EpoR.

De façon surprenante, bien que l'inhibition de l'érythropoïèse dans les CSH s'accompagne d'une diminution de l'expression des miR-144 et 451, l'expression de GATA-1 n'est pas inhibée comme dans les lignées cellulaires. Les raisons de cette différence ne sont pas encore connues, mais des résultats similaires ont été obtenus lors de l'inhibition de l'érythropoïèse dans les CSH par le TNF-α (Buck et al. 2008; Buck et al. 2009; Grigorakaki et al. 2011).

Nous avons montré que le VPA est capable d'induire dans les cellules $CD34^+$, une augmentation de l'expression des facteurs de transcription qui régulent négativement l'érythropoïèse, incluant GATA-2 et PU.1 (Morceau et al. 2004; Lowry et al. 2006). De plus, l'augmentation du facteur de transcription PU.1 est en accord avec la diminution de l'expression du miR-155 dans les cellules $CD34^+$ traitées avec de l'Epo et du VPA (Vigorito et al. 2007; Martinez-Nunez et al. 2009).

Dans les cellules souches hématopoïétiques précoces, le facteur GATA-2 est connu pour activer la transcription du gène GATA-1, puis au cours du développement érythroïde, GATA-1 va réprimer l'expression de GATA-2 (Ohneda et al. 2002). Ceci pourrait expliquer la légère augmentation de GATA-1 en corrélation avec la surexpression de GATA-2, lorsque les cellules sont traitées avec du VPA. Dans les CSH, l'activité de GATA-1 est dépendante de son interaction avec des cofacteurs comme FOG, PU.1, Fli-1 et Sp1,… (Liew et al. 2005). Il est aussi décrit dans littérature que le facteur de transcription PU.1 inhibe la différenciation érythroïde par son interaction physique avec GATA-1. L'interaction entre GATA-1 et PU.1 inhibe l'activité transcriptionnelle de GATA-1, en bloquant la liaison de ce dernier au niveau du promoteur des gènes érythro-spécifiques (Zhang et al. 2000; Stopka et al. 2005). Par la technique d'immunoprécipitation, nous avons montré que le VPA augmente l'interaction entre GATA-1 et PU.1 dans les CSH. Cette interaction pourrait expliquer la diminution de l'expression des miR et la surexpression de GATA-2, en accord avec le blocage du développement érythroïde. D'autre part, l'acétylation de GATA-1 par CBP/P300 est importante pour son activité transcriptionnelle (Boyes et al. 1998; Hung et al. 1999). Les résultats ont montré que le VPA, par son activité inhibitrice des HDAC, n'a pas augmenté le statut d'acétylation de GATA-1, ce qui suggère que l'activité transcriptionnelle de ce facteur n'est pas augmentée dans les cellules $CD34^+$ stimulées avec de l'Epo.

Puisque les érythrocytes et les mégacaryocytes dérivent de progéniteurs myéloïdes communs et qu'ils partagent de nombreux facteurs de régulation, nous avons voulu analyser l'effet du VPA sur la voie de différenciation mégacaryocytaire.
Précédemment, les travaux de notre laboratoire avaient montré que les marqueurs mégacaryocytaires n'étaient pas affectés voire plutôt activés, dans les cellules K562 et Meg-01 traitées avec du VPA. De plus, dans les cellules $CD34^+$ stimulées avec de l'Epo ou de la thrombopoïétine (TPO), le VPA n'affecte pas l'expression des marqueurs mégacaryocytaires et il induit même la formation des CFU-Meg après 7 jours de traitement (Chateauvieux et al. 2011). Comme les lignées érythroleucémiques TF1 et K562 sont des modèles érythroïdes avec un faible potentiel de différenciation mégacaryocytaire, nous avons choisi d'étudier l'effet du VPA sur la lignée cellulaire mégacaryoblastique, Meg-01.

Dans notre étude, le VPA induit des caractéristiques mégacaryocytaires comme les changements morphologiques et l'expression du marqueur spécifique CD61. Le miR-27a qui est impliqué dans le développement des mégacaryocytes par régulation de l'expression du gène RUNX1, est augmenté de façon transitoire dans les cellules Meg-01 traitées au VPA (Ben-Ami et al. 2009). Cette augmentation est en lien avec la diminution de l'ARNm de RUNX1. D'autre part, le facteur GATA-2 est capable d'inhiber l'expression du gène de miR-27a au niveau des stades tardifs de l'érythropoïèse, le tout en accord avec la transition GATA-1/GATA-2 sur les séquences GATA au niveau du promoteur. Dans les cellules Meg-01 traitées avec du VPA, nous avons observé une augmentation de l'expression de GATA-2 après 24h de traitement, lorsque l'expression du miR-27a diminue après 24h et 72h de traitement. Cependant, en accord avec la différenciation mégacaryocytaire, l'expression du miR-27a est plus forte dans les cellules traitées que dans les cellules contrôles. L'expression du facteur GATA-1 et des miR-144/451 est diminuée par le VPA dans les cellules Meg-01, comme dans les modèles cellulaires érythroïdes K562, TF1/Epo et $CD34^+$/Epo.

Ces données révèlent donc que le VPA est capable de moduler la différenciation érythro-mégacaryocytaire, en modifiant l'expression des facteurs GATA-1 et GATA-2, qui sont exprimés de façon différentes d'une lignée à l'autre et qui interagissent avec les miR (Bresnick et al. 2010). D'autres facteurs de transcription sont impliqués à la fois dans le développement érythroïde et mégacaryocytaire alors qu'ils exercent des effets opposés. Dans les cellules $CD34^+$ stimulées avec de l'Epo, nous avons montré que le VPA active l'expression des facteurs de transcription de la famille ETS, comme ETS-1, Fli-1, GABP-α ainsi que PU.1. L'augmentation de l'expression de ces facteurs est en accord avec l'inhibition de l'érythropoïèse et l'activation potentielle de la différenciation mégacaryocytaire, qui a été observée précédemment dans ces cellules (Chateauvieux et al. 2011). Le facteur de transcription Fli-1 est un régulateur positif de la mégacaryopoïèse (Hart et al. 2000), alors qu'il joue un rôle de régulateur négatif durant le développement érythroïde (Athanasiou et al. 2000). Concernant GABP-α, ce facteur est capable d'activer la transcription des gènes spécifiquement exprimés pendant les stades précoces de la mégacaryopoïèse, comme par exemple les gènes αIIb et c-mpl (Pang et al. 2006). Le facteur ETS-1 est surexprimé pendant le développement mégacaryocytaire et dans les cellules $CD34^+$. Ce facteur déclenche

l'engagement des cellules dans la voie de différenciation mégacaryocytaire au détriment de la voie érythroïde (Dore et al. 2012). Dans les CSH, l'augmentation de l'expression de ETS-1 est liée à la diminution du miR-155 lorsque les cellules sont traitées avec du VPA. Le miR-155 est exprimé fortement au niveau des progéniteurs érythroïdes $CD34^+$, mais son expression diminue durant la mégacaryopoïèse. Des travaux ont montré qu'une surexpression du miR-155 altérait la prolifération et la différenciation des mégacaryocytes, entraînant ainsi une diminution de l'expression de sa cible ETS-1 (Romania et al. 2008). D'autre part, il a été montré que le VPA est capable de générer des précurseurs mégacaryocytaires en présence d'IL3 et de SCF, ce qui correspond à nos conditions de cultures.
D'une façon générale, les résultats montrent que le VPA agit sur la balance érythro-mégacaryocytaire, à travers la modulation de l'expression des facteurs de transcription et des miR communs et spécifiques à ces voies de différenciation.

Comme les facteurs de transcription et les miR régulent fortement l'expression des gènes, nous avons analysé l'impact de la diminution de l'expression des miR-144/451 sur la différenciation érythroïde. Pour cela, nous avons utilisé un inhibiteur du miR 451 (451-Inh) et nous avons analysé son effet sur la différenciation érythroïde induite par l'Acla. Les résultats obtenus montrent que l'inhibiteur bloque la production d'hémoglobine induite par l'Acla dans les cellules K562. Bien que l'effet de l'inhibiteur soit plus faible que celui du VPA, ces résultats sont en accord avec une étude qui montre que les souris knockout pour le miR-451 présentent une légère anémie, suggérant que le miR-451 joue un rôle dans la régulation de l'érythropoïèse, mais que la répression de ce miR ne suffit pas à déclencher l'anémie (Rasmussen et al. 2010). De plus, lorsque les cellules K562 induites avec de l'Acla sont traitées avec du VPA, celui-ci inhibe l'expression de GATA-1, ce qui entraîne une diminution de l'expression des gènes érythroïdes spécifiques ainsi que le gène des miR-144/451. Lorsque les cellules K562 sont transfectées avec l'inhibiteur du miR-451 et traitées avec de l'Acla, l'effet du miR est partiellement biaisé car l'Acla entraîne une surexpression de GATA-1 et donc une augmentation de l'expression des miR-144 et 451.
Les résultats montrent donc que l'inhibition de GATA-1 est responsable de l'inhibition du développement érythroïde, alors que la diminution de l'expression des

miR-144/451 qui en résulte est partiellement impliquée dans l'effet inhibiteur du VPA.

De façon intéressante, l'inhibition du miR-451 dans les cellules K562 aboutit à une surexpression des protéines dont il cible les ARNm comme Bcl-2, AKT et c-myc (Nan et al. 2010; Li et al. 2013; Li et al. 2013). Par conséquent, la diminution par le VPA de la voie GATA-1/miR-144/451, a un impact au niveau des processus cellulaires dans les cellules érythroïdes. Cependant, il semble que le VPA module l'expression de c-myc de façon indépendante de la diminution du miR-451, suggérant un mécanisme alternatif passant certainement par la diminution de la transcription de c-myc déjà décrite (Cheng et al. 2007). D'autre part, l'augmentation de Bcl-2 et la diminution de c-myc sont en accord avec l'effet cytostatique observé dans les cellules K562. L'induction de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 pourrait donc contribuer à la survie des cellules, alors que la diminution de c-myc pourrait bloquer la division cellulaire. Il est établi que la différenciation est étroitement liée à la prolifération et la mort cellulaire. Nous pouvons donc penser qu'en plus de l'inhibition de la différenciation érythroïde, l'effet du VPA sur la prolifération, pourrait être en accord avec l'induction d'autres voies de différenciation comme les voies mégacaryocytaires et myéloïdes (Gurvich et al. 2004; Vulcano et al. 2006; Chateauvieux et al. 2011).

5.3 L'acide valproïque et son activité inhibitrice d'histone désacétylase

Alors que le VPA présente plusieurs mécanismes d'action et différentes propriétés, cet acide gras à courte chaîne est considéré comme un inhibiteur d'HDAC principalement de classe I, ainsi qu'un faible inhibiteur de classe II (Gottlicher 2004; Gurvich et al. 2004). Lors de notre étude, nous avons voulu savoir si l'activité inhibitrice des HDAC du VPA était impliquée dans l'inhibition de l'érythropoïèse.

Nous avons observé que le VPA utilisé aux concentrations de 0,5 et 1 mM, possède une activité HDAC inhibitrice, alors que seule la concentration de 1 mM inhibe les caractéristiques érythroïdes. Ce résultat suggère fortement que l'activité inhibitrice des HDAC du VPA, de classe I et IIa, n'est pas responsable de cet effet spécifique.

De plus, l'utilisation du valpromide (VPM), un analogue du VPA, dépourvu d'activité inhibitrice des HDAC et le MS-275, un inhibiteur d'HDAC spécifique de classe I,

nous ont permis de vérifier que l'activité épigénétique du VPA n'est pas requise pour bloquer la différenciation érythroïde. L'inhibition du facteur de transcription GATA-1 et des miR-144/451 n'est donc pas due à l'activité HDAC inhibitrice du VPA. Le VPM est classiquement utilisé comme un contrôle négatif, homologue du VPA (Shah et al. 2013). De façon similaire au VPA, le VPM est capable de bloquer la différenciation érythroïde comme nous l'avons montré par la diminution de la glycophorine A (GPA), un marqueur érythroïde spécifique mais aussi par la diminution de l'expression de la γ-globine, de GATA-1 et des miR-144 et 451.

Inversement, l'inhibition de la classe I des HDAC par le MS-275 n'a pas entraîné de régulation des marqueurs érythroïdes et a même conduit à une induction de l'expression de la GPA, de GATA-1 et des miR-144/451.

Il est connu que la fonction biologique essentielle des HDAC de classe I est impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire par des inhibiteurs p21 et p27 (Lagger et al. 2002). En accord avec les résultats obtenus, le MS-275 ainsi que d'autres inhibiteurs d'HDAC ont été décrits comme des inducteurs de l'expression de la γ-globine (Cao et al. 2006).

La capacité des autres inhibiteurs d'HDAC à moduler la différenciation des cellules hématopoïétiques a été décrite à travers des résultats assez divergents. Ainsi, les dérivés d'acide hydroxamique à courte chaîne d'acide gras, le butyryl-hydroxamate et propionyl-hydroxamate, le subérique bis-hydroxamique acide (SBHA) et le SAHA induisent l'expression du gène de la γ-globine *in vivo* (Cao et al. 2005). D'autres études ont montré que la TSA, un pan-HDAC inhibiteur, est capable d'inhiber la condensation et l'exclusion nucléaire au niveau des érythroblastes (Popova et al. 2009). Le Panobinostat (LBH589), un inhibiteur d'HDAC présentant des propriétés anticancéreuses, altère la maturation des mégacaryocytes et la formation des plaquettes (Iancu-Rubin et al. 2012).

Le traitement des cellules progénitrices hématopoïétiques normales, par le composé inhibiteur d'HDAC, LAQ824, montre une inhibition de la différenciation et un arrêt du cycle en phase G2/M au niveau des cellules multipotentes $CD34^+$ (Schwarz et al. 2011).

En accord avec nos résultats, des travaux ont montrés que le traitement au VPA pendant la gastrulation de la larve de Xenopus entraîne une absence complète des cellules rouges du sang (Shah et al. 2013). En revanche, cette étude montre que l'effet

du VPA est dû à son activité HDAC inhibitrice, qui est donc requise pour l'hématopoïèse primitive.

Un autre inhibiteur d'HDAC, le Givinostat, inhibe l'expression du facteur de transcription NF-E2 et du facteur c-myb dans les cellules exprimant la mutation JAK2(V617F). Ce composé va agir directement au niveau du promoteur de NF-E2. La modulation de ce facteur dans les cellules $CD34^+$, provenant de patients atteints de néoplasie myéloproliférative, entraîne une inhibition de la prolifération et de la différenciation de ces cellules vers la voie érythroïde (Amaru Calzada et al. 2012).

D'autres travaux ont montré que le VPA pouvait induire la différenciation mégacaryocytaire des cellules UT-7 (Vulcano et al. 2006). Dans ces travaux, l'activité HDAC inhibitrice du VPA est également impliquée dans l'induction de la voie mégacaryocytaire.

Ces résultats soulignent une activité complexe des molécules comme le VPA, qui présentent de multiples mécanismes d'action en dehors des activités inhibitrices d' HDAC (Mesdjian et al. 1982; VanDongen et al. 1986).

6 Conclusion et perspectives

L'ensemble des résultats nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur du VPA sur le développement érythroïde et son effet activateur sur la différenciation mégacaryocytaire. Ces effets passent par la modulation de micro-réseaux de régulation impliquant les facteurs de transcription et les miR, essentiels à la différenciation érythro-mégacaryocytaire (Figure 55).

Nos résultats ont indiqué que l'activité inhibitrice des HDAC du VPA, qui entraîne principalement l'inhibition des HDAC de classe I, n'est pas requise pour l'inhibition de la différenciation érythroïde des cellules humaines.

En effet le VPA et le VPM (qui ne possède pas d'activité inhibitrice des HDAC), inhibent tous les deux la différenciation érythroïde entraînant ainsi une diminution de l'expression de la GPA, de la γ-globine et des miR-144/451, le tout en corrélation avec l'inhibition du facteur de transcription GATA-1.

De plus, l'effet du VPA sur l'expression des facteurs de transcription de la famille ETS a confirmé l'inhibition de l'érythropoïèse, au profit de l'induction de la mégacaryopoïèse. Cette transition possible entre les deux voies de différenciation, se traduit par une augmentation de l'expression des facteurs PU.1 et ETS-1 dans les cellules $CD34^+$, qui est corrélée à la diminution du miR-155.

L'utilisation de la lignée Meg-01 nous a permis de montrer l'augmentation du marqueur de différenciation CD61, du facteur de transcription GATA-2, du miR-27a et la diminution du facteur RUNX1, confirmant ainsi l'induction de la mégacaryopoïèse par le VPA.

En conclusion, les effets du VPA sur l'hématopoïèse et plus précisément sur l'érythropoïèse, sont à prendre en considération lors de son utilisation chez les patients atteints d'un cancer et qui pourraient être susceptibles de développer une anémie.

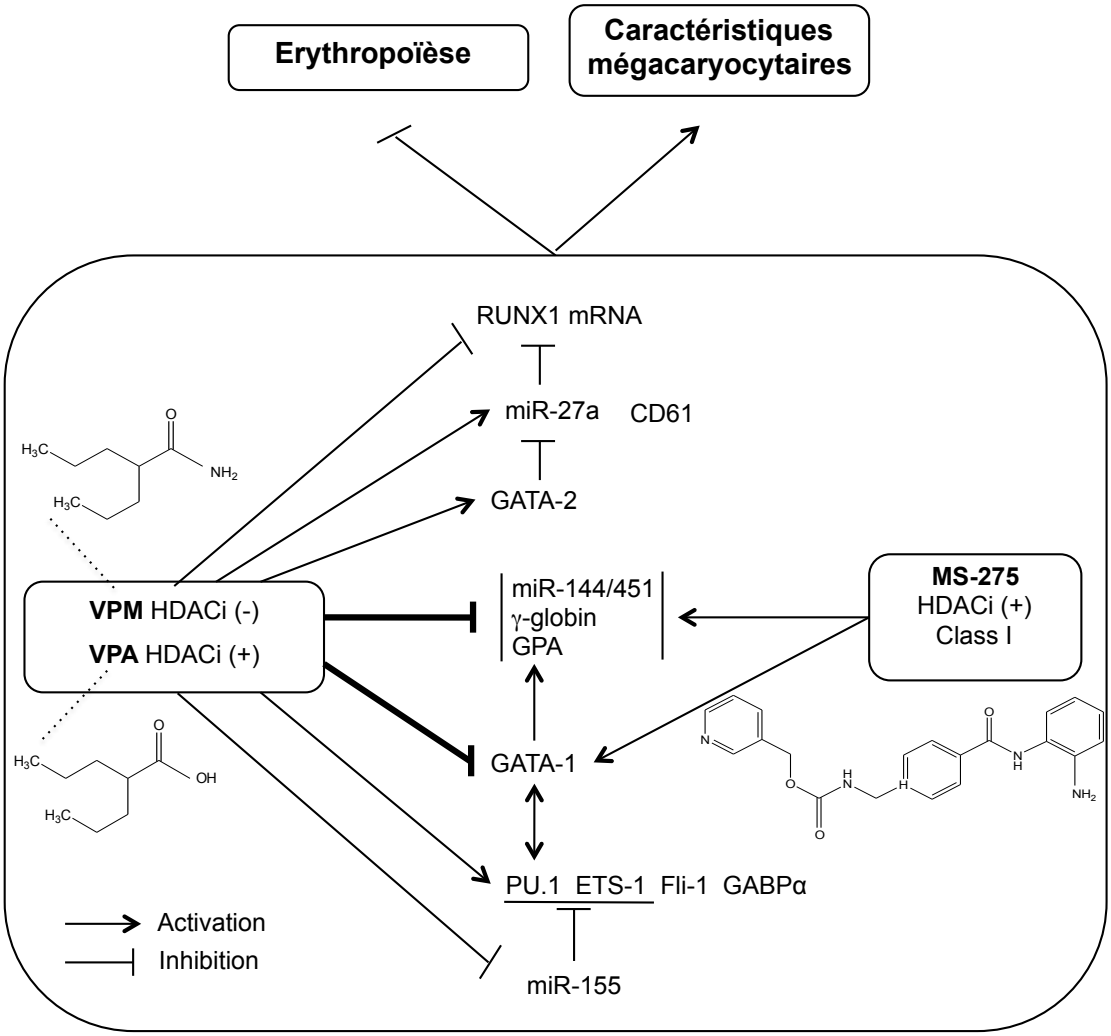


Figure 55 : Le VPA module le micro-réseau de régulation impliqué dans le développement érythro-mégacaryocytaire

Le VPA et son homologue, le VPM sans activité inhibitrice des HDAC, inhibent la différenciation érythroïde entraînant une diminution de la γ-globine, de la GPA et des miR-144/451, en corrélation avec la diminution de GATA-1 (flèches en gras). De façon opposée, l'inhibiteur d'HDAC spécifique de classe I, le MS-275, ne possède pas d'effet inhibiteur sur la différenciation, entraînant une augmentation de la γ-globine, de la GPA, des miR-144/451 et de GATA-1. Dans les cellules $CD34^+$, le VPA induit l'expression des facteurs de transcription de la famille ETS (PU.1, ETS-1, GABP-α, Fli-1) et de GATA-2**,** décrits comme des régulateurs négatifs de l'érythropoïèse, alors qu'ils activent la voie mégacaryocytaire. L'expression de PU.1 et ETS-1 est induite en corrélation avec la diminution du miR-155 et l'interaction

entre PU.1 et GATA-1 est stimulée par le VPA. La surexpression de GATA-2 est observée dans les cellules Meg-01. Le VPA induit des caractéristiques mégacaryocytaires comme l'augmentation du marqueur CD61 et du miR-27a, en corrélation avec la diminution de l'ARNm de RUNX1. Le VPA est donc capable de moduler les facteurs de régulation jouant un rôle majeur au niveau de la voie de différenciation érythro-mégacaryocytaire, comme les facteurs de transcription et les miR formant un micro-réseau de régulation.

Perspectives

L'effet inhibiteur du VPA sur la différenciation érythroïde passe par la diminution de l'expression du facteur de transcription GATA-1. Il serait intéressant d'approfondir le mode d'action du VPA sur l'expression de ce facteur, en étudiant la stabilité de l'ARNm et de la protéine de GATA-1, les modifications post-traductionnelles qui régulent son activité (acétylation, phosphorylation, ubiquitination), ainsi que les interactions avec ses cofacteurs (FOG-1, Lmo2, Tal-1, EKLF).

Le VPA inhibe la différenciation érythroïde des cellules $CD34^+$. Nous pourrions analyser l'effet du VPA sur des progéniteurs érythroïdes déjà engagés, sélectionnés positivement pour le marqueur érythro-spécifique CD36.

L'activité inhibitrice des HDAC du VPA n'est pas impliquée dans l'inhibition de l'érythropoïèse. Nous pourrions analyser si l'activité HDACi du VPA est impliquée dans l'induction de la mégacaryopoïèse, en utilisant le Valpromide qui ne possède pas d'activité inhibitrice des HDAC et le MS-275, qui est un inhibiteur des HDAC de classe I.

Le VPA module les réseaux miR/FT impliqués dans la régulation de la voie érythro-mégacaryocytaire. Nous pourrions analyser l'effet du VPA sur d'autres réseaux miR/FT impliqués dans la régulation de la différenciation myéloïde (granulocytes).

7 Bibliographie

Akashi, K., D. Traver, et al. (2000). "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." Nature **404**(6774): 193-197.

Allfrey, V. G., R. Faulkner, et al. (1964). "Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **51**: 786-794.

Amaru Calzada, A., K. Todoerti, et al. (2012). "The HDAC inhibitor Givinostat modulates the hematopoietic transcription factors NFE2 and C-MYB in JAK2(V617F) myeloproliferative neoplasm cells." Exp Hematol **40**(8): 634-645 e610.

Athanasiou, M., G. Mavrothalassitis, et al. (2000). "FLI-1 is a suppressor of erythroid differentiation in human hematopoietic cells." Leukemia **14**(3): 439-445.

Azzouzi, I., H. Moest, et al. (2011). "MicroRNA-96 directly inhibits gamma-globin expression in human erythropoiesis." PLoS One **6**(7): e22838.

Baldridge, M. T., K. Y. King, et al. (2010). "Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection." Nature **465**(7299): 793-797.

Beaumont, C. and F. Canonne-Hergaux (2005). "[Erythrophagocytosis and recycling of heme iron in normal and pathological conditions; regulation by hepcidin]." Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine **12**(2): 123-130.

Becerra, J., L. Santos-Ruiz, et al. (2011). "The stem cell niche should be a key issue for cell therapy in regenerative medicine." Stem Cell Rev **7**(2): 248-255.

Ben-Ami, O., N. Pencovich, et al. (2009). "A regulatory interplay between miR-27a and Runx1 during megakaryopoiesis." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(1): 238-243.

Bergel, M., J. E. Herrera, et al. (2000). "Acetylation of novel sites in the nucleosomal binding domain of chromosomal protein HMG-14 by p300 alters its interaction with nucleosomes." J Biol Chem **275**(15): 11514-11520.

Bessis, M. C. and J. Breton-Gorius (1962). "Iron metabolism in the bone marrow as seen by electron microscopy: a critical review." Blood **19**: 635-663.

Bhattacharya, S. K., S. Ramchandani, et al. (1999). "A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA." Nature **397**(6720): 579-583.

Bianchi, N., C. Zuccato, et al. (2012). "Involvement of miRNA in erythroid differentiation." Epigenomics **4**(1): 51-65.

Bieliauskas, A. V. and M. K. Pflum (2008). "Isoform-selective histone deacetylase inhibitors." Chem Soc Rev **37**(7): 1402-1413.

Blobel, G. A., T. Nakajima, et al. (1998). "CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2061-2066.

Boyes, J., P. Byfield, et al. (1998). "Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation." Nature **396**(6711): 594-598.

Bradbury, C. A., F. L. Khanim, et al. (2005). "Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in

response to deacetylase inhibitors." Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K **19**(10): 1751-1759.

Bresnick, E. H., H. Y. Lee, et al. (2010). "GATA switches as developmental drivers." J Biol Chem **285**(41): 31087-31093.

Broxmeyer, H. E. and C. E. Carow (1993). "Characterization of cord blood stem/progenitor cells." Journal of hematotherapy **2**(2): 197-199.

Broxmeyer, H. E., S. Cooper, et al. (2005). "Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 selectively counteracts inhibitory effects of myelosuppressive chemokines on hematopoietic progenitor cell proliferation in vitro." Stem cells and development **14**(2): 199-203.

Broxmeyer, H. E., G. W. Douglas, et al. (1989). "Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **86**(10): 3828-3832.

Buck, I., F. Morceau, et al. (2008). "Tumor necrosis factor alpha inhibits erythroid differentiation in human erythropoietin-dependent cells involving p38 MAPK pathway, GATA-1 and FOG-1 downregulation and GATA-2 upregulation." Biochemical pharmacology **76**(10): 1229-1239.

Buck, I., F. Morceau, et al. (2009). "The inhibitory effect of the proinflammatory cytokine TNFalpha on erythroid differentiation involves erythroid transcription factor modulation." International journal of oncology **34**(3): 853-860.

Burton, B. (1882). "On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetoacetate." American Chemical Journal **3**: 385-395.

Byon, J. C. and T. Papayannopoulou (2012). "MicroRNAs: Allies or foes in erythropoiesis?" Journal of cellular physiology **227**(1): 7-13.

Calabrese, J. R. and G. A. Delucchi (1989). "Phenomenology of rapid cycling manic depression and its treatment with valproate." The Journal of clinical psychiatry **50 Suppl**: 30-34.

Calleja, S., J. Salas-Puig, et al. (2001). "Evolution of juvenile myoclonic epilepsy treated from the outset with sodium valproate." Seizure : the journal of the British Epilepsy Association **10**(6): 424-427.

Calligaris, R., S. Bottardi, et al. (1995). "Alternative translation initiation site usage results in two functionally distinct forms of the GATA-1 transcription factor." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(25): 11598-11602.

Cao, H., M. Jung, et al. (2005). "Hydroxamide derivatives of short-chain fatty acid have erythropoietic activity and induce gamma gene expression in vivo." Exp Hematol **33**(12): 1443-1449.

Cao, H. and G. Stamatoyannopoulos (2006). "Histone deacetylase inhibitor FK228 is a potent inducer of human fetal hemoglobin." Am J Hematol **81**(12): 981-983.

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

Cervoni, N., N. Detich, et al. (2002). "The oncoprotein Set/TAF-1beta, an inhibitor of histone acetyltransferase, inhibits active demethylation of DNA, integrating DNA methylation and transcriptional silencing." The Journal of biological chemistry **277**(28): 25026-25031.

Cervoni, N. and M. Szyf (2001). "Demethylase activity is directed by histone acetylation." The Journal of biological chemistry **276**(44): 40778-40787.

Chang, Y., D. Bluteau, et al. (2007). "From hematopoietic stem cells to platelets." J Thromb Haemost **5 Suppl 1**: 318-327.

Chateauvieux, S., S. Eifes, et al. (2011). "Valproic acid perturbs hematopoietic homeostasis by inhibition of erythroid differentiation and activation of the myelo-monocytic pathway." Biochemical pharmacology **81**(4): 498-509.

Chateauvieux, S., F. Morceau, et al. (2010). "Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid." J Biomed Biotechnol **2010**.

Cheloufi, S., C. O. Dos Santos, et al. (2010). "A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis." Nature **465**(7298): 584-589.

Chen, H. F., L. P. Xu, et al. (2013). "Valproic acid-associated low fibrinogen and delayed intracranial hemorrhage: case report and mini literature review." Drug Des Devel Ther **7**: 767-770.

Chen, Y., R. L. Pan, et al. (2009). "Induction of hepatic differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells by the histone deacetylase inhibitor VPA." Journal of cellular and molecular medicine **13**(8B): 2582-2592.

Chen, Y., R. Sprung, et al. (2007). "Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones." Mol Cell Proteomics **6**(5): 812-819.

Cheng, Y. C., H. Lin, et al. (2007). "Downregulation of c-Myc is critical for valproic acid-induced growth arrest and myeloid differentiation of acute myeloid leukemia." Leuk Res **31**(10): 1403-1411.

Choudhary, C., C. Kumar, et al. (2009). "Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions." Science **325**(5942): 834-840.

Coppola, G., G. Auricchio, et al. (2004). "Lamotrigine versus valproic acid as first-line monotherapy in newly diagnosed typical absence seizures: an open-label, randomized, parallel-group study." Epilepsia **45**(9): 1049-1053.

de Back, D. Z., E. B. Kostova, et al. (2014). "Of macrophages and red blood cells; a complex love story." Front Physiol **5**: 9.

de Ruijter, A. J., A. H. van Gennip, et al. (2003). "Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family." Biochem J **370**(Pt 3): 737-749.

Dean, J. C. and J. K. Penry (1988). "Valproate monotherapy in 30 patients with partial seizures." Epilepsia **29**(2): 140-144.

Dessypris, E., S. E. Graber, et al. (1988). "Effects of recombinant erythropoietin on the concentration and cycling status of human marrow hematopoietic progenitor cells in vivo." Blood **72**(6): 2060-2062.

Dore, L. C., J. D. Amigo, et al. (2008). "A GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(9): 3333-3338.

Dore, L. C., T. M. Chlon, et al. (2012). "Chromatin occupancy analysis reveals genome-wide GATA factor switching during hematopoiesis." Blood **119**(16): 3724-3733.

Dore, L. C. and J. D. Crispino (2011). "Transcription factor networks in erythroid cell and megakaryocyte development." Blood **118**(2): 231-239.

Duenas-Gonzalez, A., M. Candelaria, et al. (2008). "Valproic acid as epigenetic cancer drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors." Cancer Treat Rev **34**(3): 206-222.

Dzierzak, E. and S. Philipsen (2013). "Erythropoiesis: development and differentiation." Cold Spring Harb Perspect Med **3**(4): a011601.

Elagib, K. E., F. K. Racke, et al. (2003). "RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation." Blood **101**(11): 4333-4341.

Ema, H., Y. Morita, et al. (2014). "Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells." Exp Hematol **42**(2): 74-82 e72.

Erenberg, G., A. D. Rothner, et al. (1982). "Valproic acid in the treatment of intractable absence seizures in children: a single-blind clinical and quantitative EEG study." American journal of diseases of children **136**(6): 526-529.

Eulalio, A., E. Huntzinger, et al. (2008). "Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing." Cell **132**(1): 9-14.

Felli, N., L. Fontana, et al. (2005). "MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(50): 18081-18086.

Ferreira, R., K. Ohneda, et al. (2005). "GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis." Mol Cell Biol **25**(4): 1215-1227.

Finnin, M. S., J. R. Donigian, et al. (1999). "Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors." Nature **401**(6749): 188-193.

Folmer, F., B. Orlikova, et al. (2010). "Naturally occurring regulators of histone acetylation/deacetylation." Current Nutrition & Food Science **6**: 78-99.

Friedmann, I., A. Atmaca, et al. (2006). "Synergistic effects of valproic acid and mitomycin C in adenocarcinoma cell lines and fresh tumor cells of patients with colon cancer." J Chemother **18**(4): 415-420.

Friis, M. L. (1998). "Valproate in the treatment of epilepsy in people with intellectual disability." Journal of intellectual disability research : JIDR **42 Suppl 1**: 32-35.

Fujieda, A., N. Katayama, et al. (2005). "A putative role for histone deacetylase in the differentiation of human erythroid cells." Int J Oncol **27**(3): 743-748.

Fujita, R., M. Takayama-Tsujimoto, et al. (2013). "NF-E2 p45 is important for establishing normal function of platelets." Mol Cell Biol **33**(14): 2659-2670.

Gaboli, M., P. A. Kotsi, et al. (2001). "Mzf1 controls cell proliferation and tumorigenesis." Genes Dev **15**(13): 1625-1630.

Garcia, P., O. Berlanga, et al. (2011). "c-Myb and GATA-1 alternate dominant roles during megakaryocyte differentiation." J Thromb Haemost **9**(8): 1572-1581.

Gean, P. W., C. C. Huang, et al. (1994). "Valproic acid suppresses the synaptic response mediated by the NMDA receptors in rat amygdalar slices." Brain Res Bull **33**(3): 333-336.

Geddis, A. E. (2010). "Megakaryopoiesis." Semin Hematol **47**(3): 212-219.

Gerstner, T., M. Teich, et al. (2006). "Valproate-associated coagulopathies are frequent and variable in children." Epilepsia **47**(7): 1136-1143.

Girardot, M., C. Pecquet, et al. (2010). "miR-28 is a thrombopoietin receptor targeting microRNA detected in a fraction of myeloproliferative neoplasm patient platelets." Blood **116**(3): 437-445.

Golderer, G. and P. Grobner (1991). "ADP-ribosylation of core histones and their acetylated subspecies." Biochem J **277 (Pt 3)**: 607-610.

Gottlicher, M. (2004). "Valproic acid: an old drug newly discovered as inhibitor of histone deacetylases." Ann Hematol **83 Suppl 1**: S91-92.

Gregoretti, I. V., Y. M. Lee, et al. (2004). "Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis." J Mol Biol **338**(1): 17-31.

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

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

Gregory, T., C. Yu, et al. (1999). "GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression." Blood **94**(1): 87-96.

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

Grozinger, C. M. and S. L. Schreiber (2002). "Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors." Chem Biol **9**(1): 3-16.

Grunstein, M. (1997). "Histone acetylation in chromatin structure and transcription." Nature **389**(6649): 349-352.

Gugliucci, A. (1994). "Advanced glycation of rat liver histone octamers: an in vitro study." Biochem Biophys Res Commun **203**(1): 588-593.

Gurvich, N., O. M. Tsygankova, et al. (2004). "Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation." Cancer research **64**(3): 1079-1086.

Handoko, K. B., P. C. Souverein, et al. (2006). "Risk of aplastic anemia in patients using antiepileptic drugs." Epilepsia **47**(7): 1232-1236.

Hardy, J. R., E. A. Rees, et al. (2001). "A phase II study to establish the efficacy and toxicity of sodium valproate in patients with cancer-related neuropathic pain." Journal of pain and symptom management **21**(3): 204-209.

Harikrishnan, K. N., T. C. Karagiannis, et al. (2008). "Effect of valproic acid on radiation-induced DNA damage in euchromatic and heterochromatic compartments." Cell cycle **7**(4): 468-476.

Hart, A., F. Melet, et al. (2000). "Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygously deleted in patients with thrombocytopenia." Immunity **13**(2): 167-177.

Havelange, V. and R. Garzon (2010). "MicroRNAs: emerging key regulators of hematopoiesis." Am J Hematol **85**(12): 935-942.

Hong, L., G. P. Schroth, et al. (1993). "Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA." J Biol Chem **268**(1): 305-314.

Hrabeta, J., M. Stiborova, et al. (2013). "Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. A review." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.

Hung, H. L., J. Lau, et al. (1999). "CREB-Binding protein acetylates hematopoietic transcription factor GATA-1 at functionally important sites." Mol Cell Biol **19**(5): 3496-3505.

Iancu-Rubin, C., D. Gajzer, et al. (2012). "Panobinostat (LBH589)-induced acetylation of tubulin impairs megakaryocyte maturation and platelet formation." Exp Hematol **40**(7): 564-574.

Ikonomi, P., C. E. Rivera, et al. (2000). "Overexpression of GATA-2 inhibits erythroid and promotes megakaryocyte differentiation." Exp Hematol **28**(12): 1423-1431.

Inaba, M. and Y. M. Yamashita (2012). "Asymmetric stem cell division: precision for robustness." Cell Stem Cell **11**(4): 461-469.

Inche, A. G. and N. B. La Thangue (2006). "Chromatin control and cancer-drug discovery: realizing the promise." Drug Discov Today **11**(3-4): 97-109.

Ingley, E., P. A. Tilbrook, et al. (2004). "New insights into the regulation of erythroid cells." IUBMB Life **56**(4): 177-184.

Jelkmann, W. (2011). "Regulation of erythropoietin production." J Physiol **589**(Pt 6): 1251-1258.

Kaushansky, K. (2008). "Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis." Blood **111**(3): 981-986.

Kawamoto, H., K. Ohmura, et al. (1997). "Direct evidence for the commitment of hematopoietic stem cells to T, B and myeloid lineages in murine fetal liver." Int Immunol **9**(7): 1011-1019.

Kieslich, M., D. Schwabe, et al. (2003). "Increase of fetal hemoglobin synthesis indicating differentiation induction in children receiving valproic acid." Pediatr Hematol Oncol **20**(1): 15-22.

Kitamura, T., T. Tange, et al. (1989). "Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin." Journal of cellular physiology **140**(2): 323-334.

Knoblich, J. A. (2008). "Mechanisms of asymmetric stem cell division." Cell **132**(4): 583-597.

Kornberg, R. D. and Y. Lorch (1999). "Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome." Cell **98**(3): 285-294.

Kose, G., E. Arhan, et al. (2009). "Valproate-associated coagulopathies in children during short-term treatment." J Child Neurol **24**(12): 1493-1498.

Lagger, G., D. O'Carroll, et al. (2002). "Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression." EMBO J **21**(11): 2672-2681.

Lebreton, S., G. Carraz, et al. (1964). "[Pharmacodynamic Properties of 2,2-Dipropylacetic Acid. Iii]." Therapie **19**: 457-467.

Lebreton, S., G. Carraz, et al. (1964). "[Pharmacodynamic Properties of 2,2-Dipropylacetic Acid. 2d Report on Its Anti-Epileptic Properties]." Therapie **19**: 451-456.

Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et al. (1993). "The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14." Cell **75**(5): 843-854.

Li, H. P., X. C. Zeng, et al. (2013). "miR-451 inhibits cell proliferation in human hepatocellular carcinoma through direct suppression of IKK-beta." Carcinogenesis.

Li, H. Y., Y. Zhang, et al. (2013). "MicroRNA-451 inhibits growth of human colorectal carcinoma cells via downregulation of Pi3k/Akt pathway." Asian Pac J Cancer Prev **14**(6): 3631-3634.

Liang, Y., D. Ridzon, et al. (2007). "Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues." BMC Genomics **8**: 166.

Liebich, H. M., E. Gesele, et al. (1993). "Non-enzymatic glycation of histones." Biol Mass Spectrom **22**(2): 121-123.

Liew, C. K., R. J. Simpson, et al. (2005). "Zinc fingers as protein recognition motifs: structural basis for the GATA-1/friend of GATA interaction." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(3): 583-588.

Liu, B., K. Ohishi, et al. (2010). "A potential activity of valproic acid in the stimulation of interleukin-3-mediated megakaryopoiesis and erythropoiesis." Exp Hematol **38**(8): 685-695.

Lowry, J. A. and J. P. Mackay (2006). "GATA-1: one protein, many partners." Int J Biochem Cell Biol **38**(1): 6-11.

Lunke, S. and A. El-Osta (2009). "The emerging role of epigenetic modifications and chromatin remodeling in spinal muscular atrophy." Journal of neurochemistry **109**(6): 1557-1569.

Macedo, M. F. and M. de Sousa (2008). "Transferrin and the transferrin receptor: of magic bullets and other concerns." Inflamm Allergy Drug Targets **7**(1): 41-52.

Mansson, R., A. Hultquist, et al. (2007). "Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors." Immunity **26**(4): 407-419.

Margueron, R., P. Trojer, et al. (2005). "The key to development: interpreting the histone code?" Curr Opin Genet Dev **15**(2): 163-176.

Martinez-Nunez, R. T., F. Louafi, et al. (2009). "MicroRNA-155 modulates the pathogen binding ability of dendritic cells (DCs) by down-regulation of DC-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin (DC-SIGN)." J Biol Chem **284**(24): 16334-16342.

Martirosyan, A., S. Leonard, et al. (2006). "Actions of a histone deacetylase inhibitor NSC3852 (5-nitroso-8-quinolinol) link reactive oxygen species to cell differentiation and apoptosis in MCF-7 human mammary tumor cells." The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **317**(2): 546-552.

McElroy, S. L., P. E. Keck, Jr., et al. (1989). "Valproate in psychiatric disorders: literature review and clinical guidelines." The Journal of clinical psychiatry **50 Suppl**: 23-29.

Mebius, R. E. and G. Kraal (2005). "Structure and function of the spleen." Nat Rev Immunol **5**(8): 606-616.

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

Mesdjian, E., L. Ciesielski, et al. (1982). "Sodium valproate: kinetic profile and effects on GABA levels in various brain areas of the rat." Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry **6**(3): 223-233.

Mesdjian, E., L. Ciesielski, et al. (1982). "Sodium valproate: kinetic profile and effects on GABA levels in various brain areas of the rat." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **6**(3): 223-233.

Meunier, H., G. Carraz, et al. (1963). "[Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid]." Therapie **18**: 435-438.

Miccio, A., Y. Wang, et al. (2010). "NuRD mediates activating and repressive functions of GATA-1 and FOG-1 during blood development." EMBO J **29**(2): 442-456.

Minucci, S. and P. G. Pelicci (2006). "Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer." Nature reviews. Cancer **6**(1): 38-51.

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

Morceau, F., A. Aries, et al. (1996). "Evidence for distinct regulation processes in the aclacinomycin- and doxorubicin-mediated differentiation of human erythroleukemic cells." Biochem Pharmacol **51**(6): 839-845.

Morceau, F., B. Chenais, et al. (1996). "Transcriptional and posttranscriptional regulation of erythroid gene expression in anthracycline-induced differentiation of human erythroleukemic cells." Cell Growth Differ **7**(8): 1023-1029.

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

Moreau-Gachelin, F., F. Wendling, et al. (1996). "Spi-1/PU.1 transgenic mice develop multistep erythroleukemias." Mol Cell Biol **16**(5): 2453-2463.

Mutschler, M., A. S. Magin, et al. (2009). "NF-E2 overexpression delays erythroid maturation and increases erythrocyte production." Br J Haematol **146**(2): 203-217.

Nagai, T., H. Harigae, et al. (1994). "Transcription factor GATA-2 is expressed in erythroid, early myeloid, and CD34+ human leukemia-derived cell lines." Blood **84**(4): 1074-1084.

Nakahata, T. and N. Okumura (1994). "Cell surface antigen expression in human erythroid progenitors: erythroid and megakaryocytic markers." Leuk Lymphoma **13**(5-6): 401-409.

Nan, Y., L. Han, et al. (2010). "MiRNA-451 plays a role as tumor suppressor in human glioma cells." Brain Res **1359**: 14-21.

Nathan, D., D. E. Sterner, et al. (2003). "Histone modifications: Now summoning sumoylation." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13118-13120.

Navarro, F., D. Gutman, et al. (2009). "miR-34a contributes to megakaryocytic differentiation of K562 cells independently of p53." Blood **114**(10): 2181-2192.

Nicolas, G., C. Chauvet, et al. (2002). "The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation." The Journal of clinical investigation **110**(7): 1037-1044.

Nowak, S. J. and V. G. Corces (2004). "Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation." Trends Genet **20**(4): 214-220.

O'Carroll, D., I. Mecklenbrauker, et al. (2007). "A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway." Genes Dev **21**(16): 1999-2004.

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

Olsen, C. M., E. T. Meussen-Elholm, et al. (2004). "Antiepileptic drugs inhibit cell growth in the human breast cancer cell line MCF7." Mol Cell Endocrinol **213**(2): 173-179.

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

Osley, M. A. (2004). "H2B ubiquitylation: the end is in sight." Biochim Biophys Acta **1677**(1-3): 74-78.

Ozsolak, F., L. L. Poling, et al. (2008). "Chromatin structure analyses identify miRNA promoters." Genes Dev **22**(22): 3172-3183.

Pang, L., H. H. Xue, et al. (2006). "Maturation stage-specific regulation of megakaryopoiesis by pointed-domain Ets proteins." Blood **108**(7): 2198-2206.

Peterson, C. L. (2002). "HDAC's at work: everyone doing their part." Mol Cell **9**(5): 921-922.

Pevny, L., C. S. Lin, et al. (1995). "Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1." Development **121**(1): 163-172.

Popova, E. Y., S. W. Krauss, et al. (2009). "Chromatin condensation in terminally differentiating mouse erythroblasts does not involve special architectural

proteins but depends on histone deacetylation." Chromosome Res **17**(1): 47-64.

Ramchandani, S., S. K. Bhattacharya, et al. (1999). "DNA methylation is a reversible biological signal." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(11): 6107-6112.

Rasmussen, K. D., S. Simmini, et al. (2010). "The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis." J Exp Med **207**(7): 1351-1358.

Renstrom, J., M. Kroger, et al. (2010). "How the niche regulates hematopoietic stem cells." Chem Biol Interact **184**(1-2): 7-15.

Ribeil, J. A., Y. Zermati, et al. (2007). "Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1." Nature **445**(7123): 102-105.

Riester, D., C. Hildmann, et al. (2007). "Histone deacetylase inhibitors--turning epigenic mechanisms of gene regulation into tools of therapeutic intervention in malignant and other diseases." Appl Microbiol Biotechnol **75**(3): 499-514.

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

Rodriguez-Melendez, R. and J. Zempleni (2003). "Regulation of gene expression by biotin (review)." J Nutr Biochem **14**(12): 680-690.

Rogaia, D., F. Grignani, et al. (1995). "The acute promyelocytic leukemia-specific PML/RAR alpha fusion protein reduces the frequency of commitment to apoptosis upon growth factor deprivation of GM-CSF-dependent myeloid cells." Leukemia **9**(9): 1467-1472.

Romania, P., V. Lulli, et al. (2008). "MicroRNA 155 modulates megakaryopoiesis at progenitor and precursor level by targeting Ets-1 and Meis1 transcription factors." Br J Haematol **143**(4): 570-580.

Ropero, S. and M. Esteller (2007). "The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer." Mol Oncol **1**(1): 19-25.

Rosato, R. R., J. A. Almenara, et al. (2003). "The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1 1." Cancer research **63**(13): 3637-3645.

Rosenbauer, F., K. Wagner, et al. (2004). "Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1." Nat Genet **36**(6): 624-630.

Sankaran, V. G., T. F. Menne, et al. (2011). "MicroRNA-15a and -16-1 act via MYB to elevate fetal hemoglobin expression in human trisomy 13." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(4): 1519-1524.

Sasaki, A., H. Yasukawa, et al. (1999). "Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain." Genes Cells **4**(6): 339-351.

Savickiene, J., V. V. Borutinskaite, et al. (2006). "The novel histone deacetylase inhibitor BML-210 exerts growth inhibitory, proapoptotic and differentiation stimulating effects on the human leukemia cell lines." European journal of pharmacology **549**(1-3): 9-18.

Schreiber, E., P. Matthias, et al. (1989). "Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells." Nucleic acids research **17**(15): 6419.

Schwarz, K., A. Romanski, et al. (2011). "The deacetylase inhibitor LAQ824 induces notch signalling in haematopoietic progenitor cells." Leuk Res **35**(1): 119-125.

Seidel, C., C. Florean, et al. (2012). "Chromatin-modifying agents in anti-cancer therapy." Biochimie **94**(11): 2264-2279.
Shah, R. R., A. Koniski, et al. (2013). "Regulation of primitive hematopoiesis by class I histone deacetylases." Dev Dyn **242**(2): 108-121.
Siatecka, M. and J. J. Bieker (2011). "The multifunctional role of EKLF/KLF1 during erythropoiesis." Blood **118**(8): 2044-2054.
Sinclair, A. M. (2013). "Erythropoiesis stimulating agents: approaches to modulate activity." Biologics **7**: 161-174.
Spivak, J. L. (2005). "The anaemia of cancer: death by a thousand cuts." Nature reviews. Cancer **5**(7): 543-555.
Stanley, J. S., J. B. Griffin, et al. (2001). "Biotinylation of histones in human cells. Effects of cell proliferation." Eur J Biochem **268**(20): 5424-5429.
Sterner, D. E. and S. L. Berger (2000). "Acetylation of histones and transcription-related factors." Microbiol Mol Biol Rev **64**(2): 435-459.
Stopka, T., D. F. Amanatullah, et al. (2005). "PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure." EMBO J **24**(21): 3712-3723.
Sun, F., J. Wang, et al. (2009). "Characterization of function and regulation of miR-24-1 and miR-31." Biochem Biophys Res Commun **380**(3): 660-665.
Sun, Z. W. and C. D. Allis (2002). "Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast." Nature **418**(6893): 104-108.
Szalai, G., A. C. LaRue, et al. (2006). "Molecular mechanisms of megakaryopoiesis." Cell Mol Life Sci **63**(21): 2460-2476.
Thelen, P., S. Schweyer, et al. (2004). "Expressional changes after histone deacetylase inhibition by valproic acid in LNCaP human prostate cancer cells." Int J Oncol **24**(1): 25-31.
Tsang, A. P., J. E. Visvader, et al. (1997). "FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation." Cell **90**(1): 109-119.
Ul Hussain, M. (2012). "Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action." Cell Tissue Res **349**(2): 405-413.
Undi, R. B., R. Kandi, et al. (2013). "MicroRNAs as Haematopoiesis Regulators." Adv Hematol **2013**: 695754.
VanDongen, A. M., M. G. VanErp, et al. (1986). "Valproate reduces excitability by blockage of sodium and potassium conductance." Epilepsia **27**(3): 177-182.
Varricchio, L., C. Dell'Aversana, et al. (2014). "Identification of NuRSERY, a new functional HDAC complex composed by HDAC5, GATA1, EKLF and pERK present in human erythroid cells." Int J Biochem Cell Biol **50**: 112-122.
Vegiopoulos, A., P. Garcia, et al. (2006). "Coordination of erythropoiesis by the transcription factor c-Myb." Blood **107**(12): 4703-4710.
Vettese-Dadey, M., P. A. Grant, et al. (1996). "Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro." EMBO J **15**(10): 2508-2518.
Vicente, C., A. Conchillo, et al. (2012). "The role of the GATA2 transcription factor in normal and malignant hematopoiesis." Crit Rev Oncol Hematol **82**(1): 1-17.
Vigorito, E., K. L. Perks, et al. (2007). "microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells." Immunity **27**(6): 847-859.
Vigushin, D. M. and R. C. Coombes (2002). "Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment." Anticancer Drugs **13**(1): 1-13.

Vitolo, J. M., C. Thiriet, et al. (2000). "The H3-H4 N-terminal tail domains are the primary mediators of transcription factor IIIA access to 5S DNA within a nucleosome." Mol Cell Biol **20**(6): 2167-2175.

Vulcano, F., C. Ciccarelli, et al. (2006). "HDAC inhibition is associated to valproic acid induction of early megakaryocytic markers." Exp Cell Res **312**(9): 1590-1597.

Wada, T., J. Kikuchi, et al. (2009). "Expression levels of histone deacetylases determine the cell fate of hematopoietic progenitors." J Biol Chem **284**(44): 30673-30683.

Wade, P. A., D. Pruss, et al. (1997). "Histone acetylation: chromatin in action." Trends Biochem Sci **22**(4): 128-132.

Wadman, I. A., H. Osada, et al. (1997). "The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins." Embo J **16**(11): 3145-3157.

Wen, Q., B. Goldenson, et al. (2011). "Normal and malignant megakaryopoiesis." Expert Rev Mol Med **13**: e32.

Wendling, F., K. Cohen-Solal, et al. (1996). "[Mpl ligand (thrombopoietin) and platelet regulation]." Annales pharmaceutiques francaises **54**(4): 177-182.

Westholm, J. O. and E. C. Lai (2011). "Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing." Biochimie **93**(11): 1897-1904.

Wickrema, A. and J. D. Crispino (2007). "Erythroid and megakaryocytic transformation." Oncogene **26**(47): 6803-6815.

Wondrak, G. T., D. Cervantes-Laurean, et al. (2000). "Histone carbonylation in vivo and in vitro." Biochem J **351 Pt 3**: 769-777.

Woon Kim, Y., S. Kim, et al. (2011). "The distinctive roles of erythroid specific activator GATA-1 and NF-E2 in transcription of the human fetal gamma-globin genes." Nucleic Acids Res **39**(16): 6944-6955.

Xia, Q., J. Sung, et al. (2006). "Chronic administration of valproic acid inhibits prostate cancer cell growth in vitro and in vivo." Cancer Res **66**(14): 7237-7244.

Yamamura, K., K. Ohishi, et al. (2006). "Pleiotropic role of histone deacetylases in the regulation of human adult erythropoiesis." Br J Haematol **135**(2): 242-253.

Yang, X. J. and E. Seto (2008). "The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(3): 206-218.

Yasukawa, H., A. Sasaki, et al. (2000). "Negative regulation of cytokine signaling pathways." Annu Rev Immunol **18**: 143-164.

Yoshida, M., M. Kijima, et al. (1990). "Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A." J Biol Chem **265**(28): 17174-17179.

Zardo, G., A. Ciolfi, et al. (2012). "Transcriptional targeting by microRNA-polycomb complexes: a novel route in cell fate determination." Cell Cycle **11**(19): 3543-3549.

Zeise, M. L., S. Kasparow, et al. (1991). "Valproate suppresses N-methyl-D-aspartate-evoked, transient depolarizations in the rat neocortex in vitro." Brain research **544**(2): 345-348.

Zhan, M., C. P. Miller, et al. (2007). "MicroRNA expression dynamics during murine and human erythroid differentiation." Experimental hematology **35**(7): 1015-1025.

Zhang, L., V. G. Sankaran, et al. (2012). "MicroRNAs in erythroid and megakaryocytic differentiation and megakaryocyte-erythroid progenitor lineage commitment." Leukemia **26**(11): 2310-2316.

Zhang, P., X. Zhang, et al. (2000). "PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding." Blood **96**(8): 2641-2648.

Zhang, Y. and D. Reinberg (2001). "Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails." Genes Dev **15**(18): 2343-2360.

Zhao, H., A. Kalota, et al. (2009). "The c-myb proto-oncogene and microRNA-15a comprise an active autoregulatory feedback loop in human hematopoietic cells." Blood **113**(3): 505-516.

Zhu, J. and S. G. Emerson (2002). "Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment." Oncogene **21**(21): 3295-3313.

ANNEXES

Biochemical Pharmacology 92 (2014) 299–311

Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

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

Valproic acid regulates erythro-megakaryocytic differentiation through the modulation of transcription factors and microRNA regulatory micro-networks

Anne Trécul [a], Franck Morceau [a], Anthoula Gaigneaux [a], Michael Schnekenburger [a], Mario Dicato [a], Marc Diederich [b,*]

[a] Fondation Recherche Cancer et Sang, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, 9, rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg

[b] Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:
Received 10 June 2014
Accepted 14 July 2014
Available online 21 September 2014

Keywords:
Hematopoietic differentiation
GATA-1
miR-144/451
Valproic acid

ABSTRACT

Valproic acid (VPA) exhibits important pharmacological properties but has been reported to trigger side effects, notably on the hematological system. We previously reported that VPA affects hematopoietic homeostasis by inhibiting erythroid differentiation and promoting myeloid and megakaryocyte differentiation. Here, we analyzed the effect of VPA on regulatory factors involved in erythro-megakaryocytic differentiation pathways, including transcription factors and microRNAs (miRs). We demonstrate that VPA inhibited erythroid differentiation in erythropoietin (Epo)-stimulated TF1 leukemia cells and $CD34^+$/hematopoietic stem cells (HSCs) and in aclacinomycin-(Acla)-treated K562 cells. Mir-144/451 gene expression was decreased in all erythroid and megakaryocyte models in correlation with GATA-1 inhibition. In Epo-stimulated $CD34^+$/HSCs, VPA induced the expression of the ETS family transcription factors PU.1, ETS-1, GABP-α, Fli-1 and GATA-2, which are all known to be negative regulators of erythropoiesis, while it promoted the megakaryocytic pathway. PU.1 and ETS-1 expression were induced in correlation with miR-155 inhibition; however, the GATA-1/PU.1 interaction was promoted. Using megakaryoblastic Meg-01 cells, we demonstrated that VPA induced megakaryocyte morphological features and CD61 expression. GATA-2 and miR-27a expression were increased in correlation with a decrease in RUNX1 mRNA expression, suggesting megakaryocyte differentiation. Finally, by using valpromide and the Class I HDACi MS-275, we validated that the well-described HDACi activity of VPA is not required in the inhibitory effect on erythropoiesis. Overall, this report shows that VPA modulates the erythro-megakaryocytic differentiation program through regulatory micro-networks involving GATA and ETS transcription factors and miRNAs, notably the GATA-1/miR-144/451 axis.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Valproic acid (2-propylvaleric acid, 2-propylpentanoic acid or *n*-dipropylacetic acid; VPA) is a short-chain fatty acid that has been used as an antiepileptic and a mood-stabilizing drug for many years due to its ability to modulate γ-aminobutyric acid (GABA)-dependent neurotransmission and to modify voltage-gated ion channels [1,2]. More recently, VPA has been reported to preferentially inhibit Class I histone deacetylases [3]. Published results have demonstrated the capacity of VPA to modulate the regulation of apoptosis, inflammation, proliferation and differentiation by affecting signaling pathways and regulatory factors in various cancer models [4]. Extended use of VPA in neuropsychiatry has allowed for the collection of clinical data related to hematological disorders in correlation with direct toxicity and decreased production of neutrophilic and

Abbreviations: Acla, aclacinomycin; Epo, erythropoietin; GPA, glycophorin-A; HSC, hematopoietic stem cell; miR, microRNA; VPA, valproic acid.

* Corresponding author.
E-mail addresses: marcdiederich@snu.ac.kr, marc.diederich@lbmcc.lu (M. Diederich).

http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2014.07.035
0006-2952/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

erythrocytic marrow [4,5]. In epileptic patients treated with VPA over several years, aplastic anemia, pure red cell aplasia, coagulopathies and increased fetal hemoglobin synthesis have been described [6–10]. By studying the effect of VPA on hematopoietic differentiation pathways in leukemia, we showed that VPA modifies hematopoietic homeostasis by inducing myelo-monocytic features while preventing erythroid differentiation [11].

Erythropoiesis requires the interaction of erythropoietin (Epo) with its membrane receptor (EpoR), which triggers signaling cascades that lead to the regulation of hematopoietic transcription factor activation and gene expression [12]. Activity of the major erythroid transcription factor GATA-1 is regulated through post-translational modifications and interactions with co-factors [13,14]. Importantly, the GATA-1/PU.1 complex prevents GATA-1 binding to its consensus sequence (A/T)GATA(A/G) in target genes [15]. During erythropoiesis, GATA-1 and GATA-2 expression levels balance each other [16], which is required for the development of pluripotent hematopoietic progenitors. GATA-2 prevents the terminal differentiation of erythroid cells [17] and has been shown to increase megakaryopoiesis in the absence of GATA-1 [18].

In addition to transcription factors, microRNAs (miRs) also regulate erythroid gene expression. Mirs are regulatory non-coding RNAs that block translation or destabilize mRNAs by pairing with 3′-untranslated regions. As transcription factors regulate miR gene transcription, and miRs regulate transcription factor expression, this crosstalk results in a complex regulatory network [19]. Mirs are known to be involved in hematopoiesis [20,21], and the following miRs regulate erythropoiesis: miR-221/222, miR-144/451, miR-15a, miR-16-1, miR-126 and miR-210 [22]. The gene cluster encoding miR-144/451 is regulated by GATA-1, as reported in zebrafish and murine G1E cells. Mature miR-144 and miR-451 are specifically expressed in erythroid cells [21,23], and increased miR-451 expression is associated with a significant decrease in AKT and Bcl-2 expression [24,25]. Moreover, c-myc expression is repressed by miR-451 in correlation with predicted targeting of c-myc mRNA by miR-451 [26,27]. Moreover, PU.1 and ETS-1 have been described as targets of miR-155 [28,29], while RUNX1 regulates transcription of the miR-221/222 and miR-27a genes [30,31]. As a negative regulatory loop, miR-27a targets RUNX1 mRNA during megakaryocytic differentiation [30], and the miR-27a gene is regulated by a GATA-1/GATA-2 switch in erythropoiesis [32]. Interestingly, the GATA and ETS family of transcription factors (e.g., GATA-1, GATA-2, ETS-1, PU.1, Fli-1 and GABPα) are involved in an erythro-megakaryocytic differentiation program by activating one pathway and repressing the other [18,29,33–36].

The involvement of specific miRs and transcription factors in VPA-mediated perturbation of hematopoiesis was investigated in this study. The requirement of HDAC inhibitory (HDACi) activity of VPA was evaluated by using valpromide (VPM), a VPA analog lacking HDACi activity, and the specific Class I HDAC inhibitor MS-275. The results showed that VPA down-regulated GATA-1/miR-144/451 in correlation with inhibition of erythropoiesis in Epo-stimulated TF1 and hematopoietic stem cells (HSCs). In HSCs, VPA stabilized the GATA-1/PU.1 complex and induced overexpression of transcription factors that negatively regulate erythropoiesis, while promoting megakaryopoiesis via GATA-2 and ETS transcription factors. Modulation of transcription factors correlated with changes in related miRs including miR-144/451, miR-27a, and miR-155, leading to the conclusion that VPA modulates an erythro-megakaryocytic transcription factor/miR regulatory micro-network. Moreover, our results reveal that HDACi activity of VPA is not required for its inhibitory activity on erythropoiesis.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and treatments

The human leukemia cell lines TF1, K562, and MEG-01 (DSMZ, Braunschweig, Germany) were cultured in RPMI 1640 (BioWhittaker®, Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (BioWhittaker®) and 1% antibiotic-antimycotic (BioWhittaker®). TF1 cells were grown in the presence of 5 ng/mL human recombinant GM-CSF (Tebu-Bio, PeproTech, Boechout, Belgium) or 10 U/mL human recombinant erythropoietin (Epo; Epoetin Beta, NeoRecormon, Roche Pharma AG, Grenzach-Whylen, Germany) in the culture medium to induce erythroid differentiation. All cells were cultured in an incubator at 37 °C, 95% humidity, and 5% CO_2. Medium was renewed every 3 days, and the cells were resuspended at a concentration of 2×10^5 cells/mL. K562 cells were induced to differentiate with 10 nM aclacinomycin A (Acla; Sigma–Aldrich Bornem, Belgium). Meg-01 cells were induced toward the megakaryocytic pathway with 100 nM of phorbol ester 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA; Sigma–Aldrich).

Human umbilical cord blood was obtained from the Clinique Bohler, Luxembourg, with a written informed consent for use of hematopoietic stem cells (HSCs) in research, in agreement with the National Committee of Research Ethics in Luxembourg. $CD34^+$/HSCs were selected using magnetic cell sorting (MACS Miltenyi, Utrecht, The Netherlands) and cultured as previously described [37]. After 3 days of culture, the medium was renewed, and erythroid differentiation was induced by adding 2 U/mL human recombinant Epo to the medium for 4 days. All cells were treated with 1 mM VPA, 1 mM VPM (Sigma), 0.1 μM MS-275 (Enzo Life Sciences BVBA, Antwerpen, Belgium) or suberoylanilide hydroxamic acid SAHA (Cayman Chemical Company, Bio-connect, Huissen, The Netherlands). VPM is a VPA-related compound devoid of HDACi activity and MS-275 (MS) is a Class I HDAC-specific inhibitor of erythroid differentiation. VPA was used at 1 mM, in accordance with previous investigations [11] and other references related to VPA studies on hematopoietic cells differentiation [3,38,39]. VPM was used at the same concentration as VPA. MS-275 was used at 0.1 μM, which allows for HDACi activity without cytotoxic effects in our cell models. SAHA was used at 1 μM, in accordance with the literature [40] for TF1 cells.

2.2. Cell proliferation, viability, morphology, and erythroid differentiation

Cell viability was estimated by performing Trypan blue exclusion tests. Cells were processed through a semi-automated image-based cell analyzer to quantify living cells among the total population (Cedex XS Innovatis, Roche, Luxembourg). The percentage of cell viability was calculated by comparing the number of total cells with the number of dead cells. The fold increase in cell proliferation was determined in control cultures and treated cultures by calculating the ratios Nc/N0 = Rc and Nt/N0 = Rt, where Nc and Nt are the number of viable cells at the different time points in control cultures and in treated cultures, respectively. N0 is the number of viable cells in initial cultures at 0 h, and the fold change in cell proliferation at 0 h (N0/N0) is R0 = 1. When $Rt < R0$, treatment was considered cytotoxic; $R0 < Rt < Rc$ treatment was considered cytostatic, and Rt = Rc indicates that the treatment had no effect on cell proliferation.

For morphological observations, cytospin preparations of cells were stained with May-Grünwald/Giemsa (MGG) solution (Merck, Leuven, Belgium). Determination of erythroid differentiation was scored by the benzidine staining method. Images were captured using a Leica DM 2000 microscope.

2.3. Cell-cycle analysis

Cell-cycle distribution was analyzed according to standard procedures based on DNA staining with propidium iodide (1 μg/mL, Sigma–Aldrich) and RNase A (100 μg/mL; Roche) in PBS before analysis by FACS (FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences)). Events were recorded statistically (10,000 events/sample) using the CellQuest software (BD Biosciences). Then, the data were analyzed by using FlowJo® software (version 8.8.7, Tree Star, Ashland Oregon, USA).

2.4. Flow cytometry

A total of 300,000 TF1, Meg-01, and $CD34^+$ cells were washed twice in 1× PBS. Cell pellets were then re-suspended in 100 μL of 1× PBS and 5 μL of antibody for 30 min at 4 °C. FITC-labeled CD61 (clone Y2/51) or PE-Cy™ 5-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. After 30 min, the analysis was performed on a FACSCalibur flow cytometer. The statistical analysis was based on 10,000 events per sample using FlowJo® software (version 8.8.7, Tree Star, Ashland Oregon, USA).

2.5. Western blot

Nuclear and cytoplasmic proteins were extracted from 5,000,000 cells, as previously described [41]. Histones were enriched as previously described [42].

Protein concentrations were determined by the Bradford method using BioRad reagent (BioRad Laboratories). Twenty micrograms of denatured protein extracts were resolved on a 10% SDS–polyacrylamide gel. The separated proteins were then transferred to a PVDF membrane (GE Healthcare, Roosendaal, The Netherlands). The membranes were blocked in phosphate-buffered alkaline/0.1% Tween 20 (PBS-T) 1X, supplemented with 5% milk or 5% BSA according to the antibody manufacturer recommendation, then probed with the following primary antibodies: GATA-1 (C20X), GATA-1 (N1X), GATA-2 (H-116), PU.1 (T-21), NF-E2 (C-19), γ-globin (hemoglobin-γ, 51-7), Fli-1 (C-19), ETS-1 (C-20), and GABP-α (H-180) (Santa Cruz Biotechnology, Tebu-Bio, Boechout, Belgium); Bcl-2 (Calbiochem, Leuven, Belgium); AKT; c-myc (Cell Signaling, Leiden, The Netherlands); acetylated lysine (AB3879), acetylated histone H4 (06-866), and histone H4 (clone 62-141-13, 05-858) (Millipore, Brussels, Belgium); and β-actin (Sigma) and probed again with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Amersham Biosciences). Coomassie blue (LKB, Villeneuve-la-Garenne, France) was used as a loading control for histone proteins. Every step (membrane saturation and probing) was followed by three washes in PBS-T. The immunoreactive proteins were visualized using an enhanced chemiluminescence system kit (ECL PlusWestern Blotting Detection System, GE Healthcare, Roosendaal, The Netherlands) and the ImageQuant LAS 4000 mini system (GE Healthcare). Quantification of western blots was performed using Image-Quant TL (GE Healthcare) and the Rolling Ball method for background subtraction.

2.6. Immunoprecipitation assays

Immunoprecipitation assays were performed using MACS protein G microbeads (MACS Miltenyi). Nuclear and cytoplasmic proteins from HSCs (200 μg) were incubated with 2 μg of anti-human GATA-1 (goat-C20X) antibody (Santa Cruz Biotechnology) and 100 μL of protein G beads in 100 μL of water. The mixture was gently stirred overnight at 4 °C. According to the manufacturer's instructions, the immune complex was immobilized in a micro-MACS separation column and then isolated. Immunoprecipitated proteins were loaded on an SDS–PAGE electrophoresis gel followed by western blotting. PU.1 was detected using an anti-human PU.1 antibody (T-21). GATA-1 was detected using an anti-human GATA-1 (rat-N1) antibody and an anti-rat horseradish peroxidase-conjugated IgG as a secondary antibody to avoid crosslink with the GATA-1 C20X antibody (all from Santa Cruz Biotechnology). Acetyl-GATA-1 was detected using an anti-human acetyl-lysine antibody (Millipore, Brussels, Belgium).

2.7. Total RNA extraction, reverse transcription, and real-time PCR

All reagents used were treated with anti-RNase. The total RNA extraction and the quantification of RNA were performed as previously described [43].

Reverse transcription was performed on 1 μg of total RNA using the miScript II RT Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) according to the manufacturer's protocol. The samples were then incubated for 60 min at 37 °C and 5 min at 95 °C to inactivate the enzymes.

Real-time PCR analyses were performed using the miScript SYBR® Green PCR Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol with the following specific miR primers: miR-221, AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC; miR-222, AGCUACAUCUGGCUACUGGGU; miR-15a, AGCUACAUCUGGCUACUGGGU; miR-16, UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG; miR-451, AAACCGUUACCAUUACUGAGUU; miR-144, UACAGUAUAGAUGAUGUACU; miR-27a, UUCACAGUGGCUAAGUUCCGC; miR-155, UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU. A pre-miR-144-specific primer-targeting loop was used to analyze pre-miR-144/451 expression. With regard to RUNX1, real-time PCR analysis was performed using the Mesa Green qPCR MasterMix Plus for SYBR1 Assay (Eurogentec, Seraing, Belgium) according to the manufacturer's protocol with the following specific primers: RUNX1 forward, 5′-CCTCAGGTTTGTCGGTCGAA-3′ and β-actin forward, 5′-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3′. Real-time PCR was performed using a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Lennik, Belgium). Experiments were performed in triplicate, and expression levels were normalized using the internal standard gene RNU1A for miRNA and β-actin for RUNX1. Relative gene expression levels correspond to fold induction compared with untreated cells.

2.8. Cell transfection

K562 cells were transfected with the anti-hsa-mir-451-inhibitor (Qiagen) using the JetPRIME reagent (Polyplus transfection, Westburg, Leusden, Pays-Bas). The transfection mix (200 μL of 10, 50, and 100 nM of oligonucleotide in jetPRIME buffer and 4 μL of JetPRIME reagent) was incubated for 15 min at room temperature. Following incubation, the transfection mix was added to the cells in serum containing medium and incubated for 18 h. The medium was then renewed, and the cells were treated or not with 1 mM VPA. Mock transfections were performed using anti-hsa-mir-451-inhibitor-free transfection mix.

2.9. Statistics

The data were analyzed using GraphPad Prism 6 software. The groups were compared using Student's *t*-test (two conditions) or ANOVA (several conditions). In the case of ANOVA, group means were compared using Holm-Sidak test. The difference between the series "control" and the series "treated" was considered significant for values of $p < 0.0001$ represented by ****, $p < 0.001$ by ***, $p < 0.01$ by **, and $p < 0.05$ by *. The results represent the mean ± standard deviation.

3. Results

3.1. VPA impairs Epo-mediated erythroid differentiation without cytotoxic effects

The effects of VPA were assessed on Epo-mediated erythroid differentiation of the erythroleukemia TF1 cell line and CD34$^+$ hematopoietic stem cells (HSCs). TF1 cells were induced to differentiate with Epo and were co-treated with 0.5 and 1 mM VPA for 0, 6, 24, and 48 h. Flow cytometry analysis showed that 1 mM VPA induced a progressive decrease in the expression of the erythroid marker glycophorin-A (GPA), while 0.5 mM had no effect. The results were confirmed by the analysis of the rate of hemoglobinization by the benzidine staining method at 72 h, when hemoglobin production was clearly detectable (Fig. 1A). The results showed that Epo induced 36.2% of cells to be benzidine positive (B+), while GM-CSF did not induce hemoglobinization. VPA at 0.5 mM did not prevent this induction; the rate of B+ cells remained at 34.8%. However, the results of benzidine staining assays for 1 mM VPA were not obtained due to the low cell viability and cell proliferation at 72 h as shown in Fig. 1B. Cell viability significantly decreased from 95.7% at 0 h to 54.6% at 72 h for the 1 mM treatment, while viability remained at 82.8% after 0.5 mM VPA treatment at 72 h. In Epo-treated cell cultures, cell proliferation increased by 2.6-fold at 48 h compared with cultures at 0 h. At 24 h, cell-cycle analysis revealed an accumulation of cells in sub-G0 corresponding to an apoptotic effect (Fig. 1B). However, Trypan blue assays showed that viability remained at 81% after 24 h and decreased to 61% after 48 h (Fig. 1B). Moreover, in 1 mM VPA-treated cell cultures, cell growth increased by 1.2-fold only at 24 h, corresponding to a cytostatic effect.

VPA-mediated inhibition of erythroid differentiation was then confirmed using Epo-stimulated CD34$^+$ HSCs. After 4 days of VPA treatment, the rate of B$^+$ cells decreased by 69%, and the MFI value of GPA expression was reduced by 33%, as assessed by flow cytometry (Fig. 1C). In HSCs, VPA had no cytotoxic effect after 4 days of treatment; cell viability remained at the level of Epo-stimulated control cells (93.6%), showing that VPA inhibits erythroid differentiation independent of a cytotoxic effect. Interestingly, VPA has no effect on HSC cell cycle and proliferation showing that VPA has no cytostatic effect here (Fig. 1D). Nevertheless, cell viability decreased by 55% after 7 days (Fig. 1D).

3.2. VPA modulates erythropoiesis-related miRNAs

We previously showed that VPA prevented chemically induced hemoglobinization of K562 cells [11]. To determine whether the effect of VPA on differentiation correlated with a modulation of erythropoiesis-related miR expression, we measured mature miR-221, miR-222, miR-15a, miR-451, miR-144, and miR-16 expression in Epo-stimulated TF1 (Epo/TF1) cells treated with 1 mM VPA. Real-time PCR analysis showed that VPA modified miR expression in these cells compared with Epo treatment. All studied miRs were down-regulated, except for miR-221, showing that the decrease in miR expression was not a general effect of VPA in these cells (Fig. 2A). The effect of VPA was then analyzed on the basal expression of the same panel of miRs in the K562 cell line after 6, 24, and 72 h of treatment.

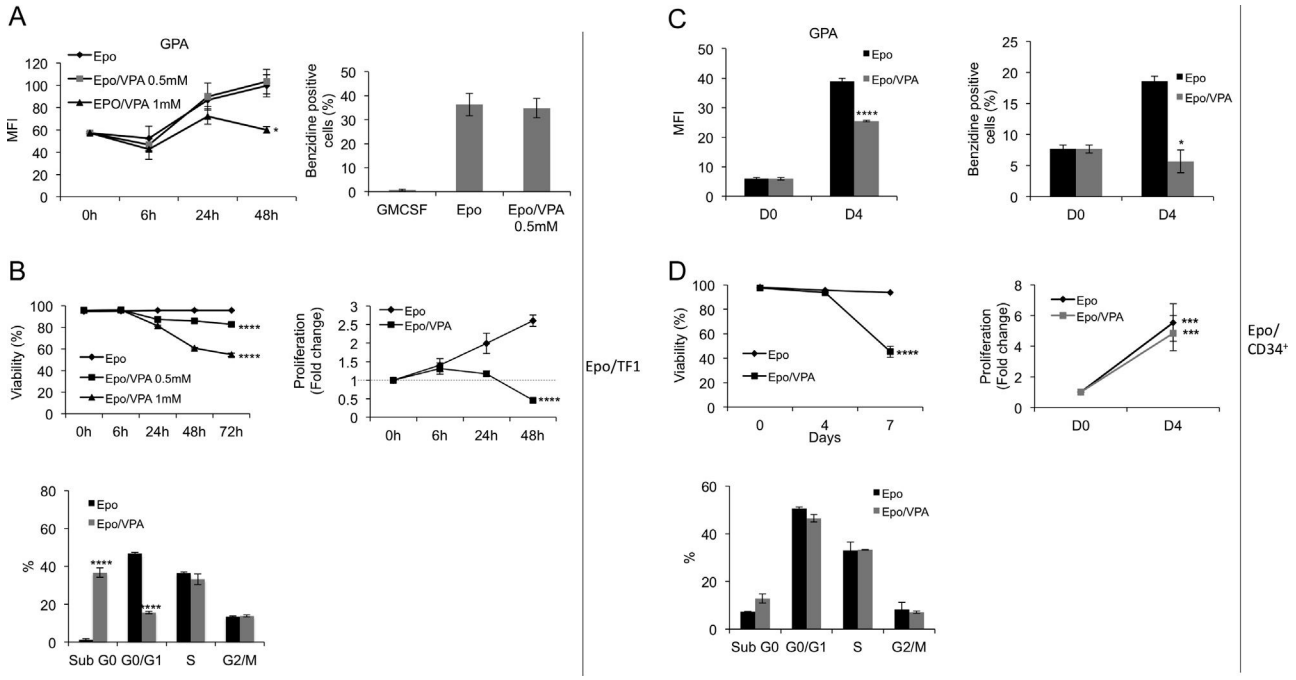


Fig. 1. VPA affects Epo-mediated erythroid differentiation. (A) Mean florescence intensities (MFI) of glycophorin-A (GPA) were analyzed by flow cytometry in Epo-stimulated TF-1 (Epo/TF1) cells treated by VPA according to the indicated concentrations and times (left panel). Hemoglobin-producing cells were scored by benzidine staining assays in GM-CSF-stimulated cells as well as in untreated or 0.5 mM VPA-treated Epo/TF1 cells for 72 h (right panel). (B) Effect of VPA on cell viability at the indicated concentrations and times was evaluated in Epo/TF1 cells by Trypan blue staining. Epo/TF1 cell proliferation was evaluated during a culture time course with or without 1 mM VPA treatments at the indicated times. Cell proliferation was expressed as the fold change of the cell number at each time point relative to the point 0 h. Cell-cycle analysis was performed by propidium iodide staining and flow cytometry after 24 h in Epo/TF1 cells treated by 1 mM VPA. (C) MFIs of glycophorin-A (GPA) were determined by flow cytometry in Epo-stimulated CD34$^+$/HSC (Epo/CD34$^+$) treated by 1 mM VPA for 0 and 4 days (left panel). Hemoglobin-producing cells were scored by benzidine staining assays in Epo/CD34$^+$ treated by 1 mM VPA for 0 and 4 days (right panel). (D) Effect of VPA 1 mM on Epo/CD34$^+$ cell viability was evaluated at the indicated times by Trypan blue staining. Cell proliferation was evaluated in Epo-stimulated CD34$^+$ cells treated with 1 mM VPA for 0 and 4 days. Cell proliferation was expressed as the fold change of the cell number at each time point relative to the point day 0 (D0). Cell-cycle analysis was performed by propidium iodide staining and flow cytometry after 4 days in Epo/CD34$^+$ cells treated by 1 mM VPA. The results are representative of at least three independent experiments and represent the mean ± standard deviation. $^{****}p < 0.0001$, $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, and $^{*}p < 0.05$. The asterisks (*) are positioned beside or above graphs to indicate the significance of the global effect of treatment or specific effect by pairwise comparisons, respectively.

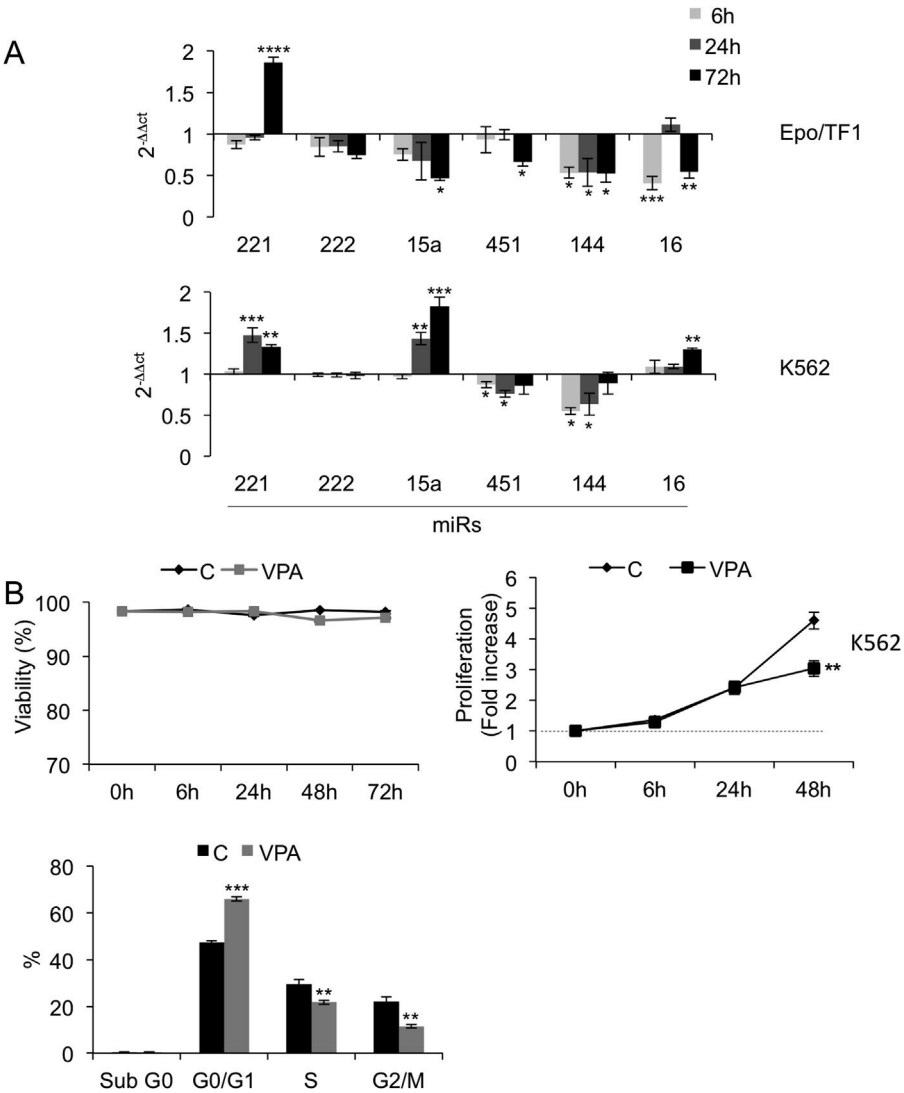


Fig. 2. VPA affects miR expression related to erythropoiesis. (A) Epo-stimulated TF1 cells (Epo/TF1) and K562 cells were treated with VPA 1 mM for 6, 24, and 72 h or left untreated (control cells). Total RNA was extracted, and miR expression was measured by real-time PCR analysis. The results were evaluated using the "$2^{-\Delta\Delta ct}$" method, by normalizing to the small nuclear RNA RNU1A expression at each time point and to the control cells (untreated) at each time point, as the average ± standard deviation of at least three independent experiments. (B) Effect of 1 mM VPA vs. control cells "C" on cell viability and cell proliferation was evaluated at the indicated times in K562 cells. The percentage of cell viability was evaluated by Trypan blue staining. Cell proliferation was expressed as the fold change of the cell number at each time point relative to the point 0 h. Cell-cycle analysis was performed by propidium iodide staining and flow cytometry after 48 h of VPA treatment. The results are representative of at least three independent experiments and represent the mean ± standard deviation. $^{****}p < 0.0001$, $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, and $^{*}p < 0.05$. The asterisks (*) are positioned beside or above graphs to indicate the significance of the global effect of treatment or specific effect by pairwise comparisons, respectively.

Even though the expression of most of miRs was modulated by VPA in K562 cells, only miR-144 and miR-451 were down-regulated as early as 6 h after treatment (Fig. 2A). VPA had no effect on cell viability of K562 cells and displayed a cytostatic effect at 48 h (Fig. 2B), which was confirmed by cell-cycle analysis with an accumulation of cells in G0/G1 phase (Fig. 2B).

3.3. VPA down-regulates miR-144/451 gene transcription along with the inhibition of erythroid differentiation and GATA-1 expression

Interestingly, miR-144 and miR-451 were down-regulated in both Epo/TF1 and K562 cells. The miR-144/451 gene was positively regulated by GATA-1 transcription factor. The ability of Epo to induce miR-144 and miR-451 expression in correlation with GATA-1 was assessed in TF1 cells. Real-time PCR analysis showed a 35- and 50-fold increase in miR-144 and miR-451 expression, respectively, in Epo-treated cells at 72 h, with the 0 h control point normalized to 1. GM-CSF had a substantially lower effect, inducing a 10- and 13-fold increase, respectively. Accordingly, GATA-1 expression levels in GM-CSF- and Epo-treated cells correlated with miR-144/451 relative expression (Fig. 3A). GATA-1 expression levels were higher in Epo-treated TF1 cells compared with GM-CSF-treated cells. GM-CSF/Epo co-treatments confirmed the effect of Epo as a GATA-1 inducer in TF1 cells. Analysis of GATA-1 protein expression in VPA-treated Epo/TF1 and K562 cells at 6, 24, and 48 h showed that GATA-1 expression decreased as soon as 6 h in both cell lines in correlation with miR-144/451 down-regulation (Fig. 3B).

The expression levels of mature miRs (144 and 451) as well as pre-miR (144/451) were analyzed by real-time PCR after aclacinomycin (Acla)-induced differentiation of K562 cells. Acla is an inducer of hemoglobin (Hb) production and GATA-1 expression in K562 cells [44,45]. Real-time PCR analysis showed increased expression levels of the mature miR-144 and miR-451 in Acla-treated cells, which were prevented by VPA (Fig. 4A). This result indicated that VPA-mediated inhibition of miR expression was not

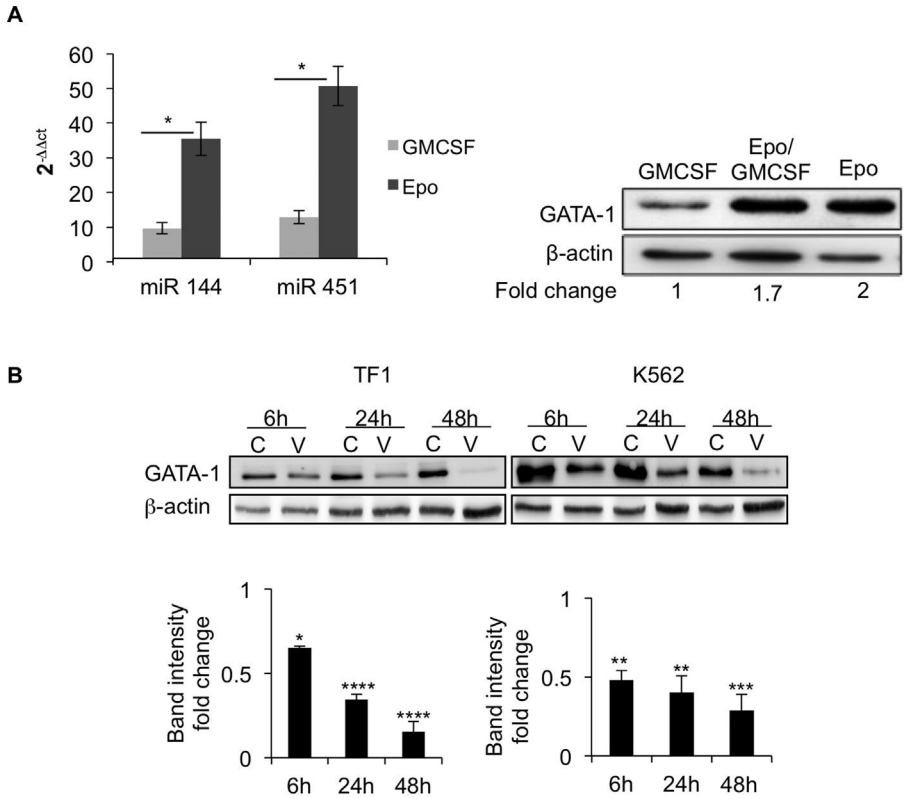


Fig. 3. miR-144/451 and GATA-1 expression levels correlate with each other. (A) Total RNA was extracted from GM-CSF- or Epo-stimulated TF1 cells after 72 h of culture and miR-144 and miR-451 expressions were analyzed by real-time PCR. The results are expressed according to the "$2^{-\Delta\Delta ct}$" method by normalizing to the small nuclear RNA RNU1A expression at each time point and to the control cells (untreated) at each time point, as the average ± standard deviation of at least three independent experiments. Expression of miRs was correlated to western blot analysis of GATA-1 expression in nuclear extracts from GM-CSF-, GM-CSF/Epo-, or Epo-stimulated-TF1 cells after 72 h of culture. β-Actin levels were used as a loading control. The band intensity obtained in control cells "GMCSF" was set as 1, and the relative fold change was determined. (B) Western blot analysis of GATA-1 expression was performed on nuclear extracts from Epo/TF1 and K562 cells treated with 1 mM VPA (V) for the indicated times or left untreated (control, C). The level of β-actin protein was used as loading control. Band intensities on blots were quantified and normalized to β-actin. The band intensity obtained in control cells was set as 1, and the relative fold change was determined and shown as the mean ± the standard deviation of at least three independent experiments. The results are representative of at least three independent experiments and represent the mean ± standard deviation. $^{****}p < 0.0001$, $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, and $^{*}p < 0.05$.

directly related to Epo/EpoR signaling. Interestingly, pre-miR-144/451 expression levels were increased in Acla-treated K562 cells compared with control cells. VPA also reduced this induction of pre-miR-144/451 by 53%, indicating that VPA affected miR-144/451 gene expression at the transcriptional level (Fig. 4A). This effect likely occurs through VPA-mediated inhibition of GATA-1 expression, as supported by its correlated modulation under Acla- and Acla/VPA-treated conditions (Fig. 4B). K562 cell viability was not affected by 72 h of Acla or Acla/VPA treatments (Fig. 4C).

3.4. VPA inhibits miR-144/451 and promotes GATA-1/PU.1 interaction in Epo-stimulated CD34$^+$/HSCs

The effects of VPA on miR-144/451 was then studied in Epo-stimulated CD34$^+$/HSCs. After 4 days of VPA treatment, miR-144 and miR-451 expression levels were 3.3- and 5-fold down-regulated, respectively, compared with Epo-stimulated cells, which were normalized to 1 (Fig. 5A). This result confirmed the ability of VPA to down-regulate these miRs in erythroid lineage cells. Nevertheless, VPA did not trigger changes in the expression level of the GATA-1 transcription factor in these cells. NF-E2, another transcription factor involved in the erythro-megakaryocyte differentiation pathway, was also not affected (Fig. 5B). We then focused on the negative regulators of erythropoiesis, GATA-2 and PU.1, which act by inhibiting GATA-1 activity. Western blot analysis showed that both transcription factors were up-regulated in VPA-treated CD34$^+$/HSCs (Fig. 5B), and up-regulation of PU.1 correlated with decreased miR-155 expression (Fig. 5A). Considering the concomitant overexpression of GATA-1 and PU.1 in VPA-treated HSCs, we analyzed the PU.1/GATA-1 interaction in Epo-stimulated HSCs in the presence or absence of VPA through immunoprecipitation assays. The results showed that GATA-1 and PU.1 co-immunoprecipitated in the presence of VPA, indicating the interaction of both transcription factors (Fig. 5C). Moreover, as GATA-1 transcriptional activity is dependent on its acetylation, we assessed the effect of VPA on the acetylation status of GATA-1. As evaluated by immunoprecipitation and immunoblotting using an anti-acetyl-lysine antibody, GATA-1 was not hyper-acetylated in VPA-treated HSCs compared with EPO-stimulated cells, in agreement with the absence of activation of this transcription factor (Fig. 5D).

3.5. Inhibition of miR-451 contributes to VPA-mediated hemoglobinization

To verify that VPA-mediated inhibition of miR-144/451 expression contributes to erythropoiesis impairment, miR-451 was specifically inhibited in Acla-treated K562 cells overexpressing GATA-1. We triggered miR-451 down-regulation by transfecting an miR-451-inhibitor (451-Inh) into K562 cells. The transfection efficiency of 451-Inh in K562 cells was validated by using different concentrations of 451-Inh. Real-time PCR analysis showed that transfection of 451-Inh reduced the amount of detectable endogenous miR-451 at 24 h in a concentration-dependent manner without affecting K562 cell viability even at 100 nM, which we used in the following experiments (Fig. 6A). The rate of Hb-producing cells was assessed at 72 h in Acla-treated cells either in the presence of VPA (Fig. 6B left) or in 451-Inh-transfected cells

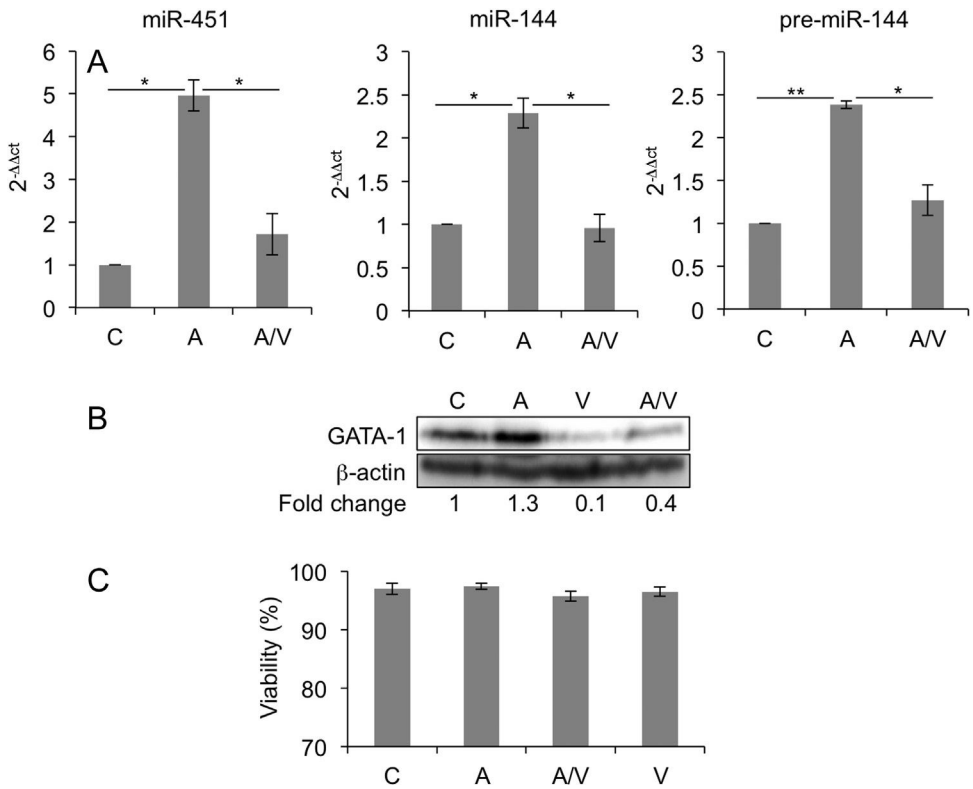


Fig. 4. VPA prevents aclacinomycin-(Acla)-induced miR-144/451 expression in K562 cells. K562 cells were left untreated (control C) or treated with 10 nM Acla "A" or co-treated with Acla and VPA 1 mM "A/V" for 72 h. (A) Total RNA was extracted, and mature miR-451 and -144 as well as pre-miR-144/451 (pre-miR-144) expression levels were analyzed by real-time PCR. The results were evaluated using the "$2^{-\Delta\Delta ct}$" method by normalizing to the small nuclear RNA RNU1A expression and to the control cells (untreated) as the average ± standard deviation of at least three independent experiments. (B) Nuclear extracts from control K562 cells "C", Acla "A", VPA "V" or Acla-VPA "A/V" treatment were analyzed for GATA-1 expression by western blot. The level of β-actin protein was used as loading control. Band intensities on blots were quantified and normalized to β-actin. The band intensity obtained in control cells was set as 1, and the relative fold change was determined. (C) Percentages of cell viability were evaluated by Trypan blue staining. The results are representative of at least three independent experiments and represent the mean ± standard deviation. $^{**}p < 0.01$ and $^{*}p < 0.05$.

(Fig. 6B, right). The percentage of B^+ cells in Acla-treated cells (52%) was similar to that of Acla-treated mock-transfected cells (57%). In Acla/VPA-treated cells, hemoglobinization was prevented and decreased to 6.9% of B^+ cells in correlation with GATA-1 inhibition (Fig. 4B), as expected from previous data [11]. In transfected cells, 451-Inh significantly decreased the rate of benzidine-positive cells by 10%, despite the remaining induction of GATA-1 by Acla (Fig. 6B). This result suggested that the inhibition of miR-451 contributes to reduced Hb production in K562 cells. In addition, we analyzed AKT, Bcl-2, and c-myc protein expression levels, whose mRNAs are targeted by miR-451. Transfection of K562 cells with 25 and 100 nM of 451-Inh triggered a concentration-dependent increase in Bcl-2, AKT, and c-myc expression at 24 h in correlation with the decreased miR-451 levels, validating the inhibition of miR-451 activity in K562 cells (Fig. 6C). VPA treatment for 24 h increased AKT and Bcl-2 protein expression levels in agreement with miR-451 down-regulation. Conversely, VPA decreased c-myc expression, suggesting that VPA promoted an alternative post-translational regulation for this protein independent of miR-451 (Fig. 6C).

3.6. HDACi activity of VPA is not required for erythropoiesis inhibition

To evaluate the potential contribution of the HDAC inhibitory (HDACi) activity of VPA in its effect on erythropoiesis, we further analyzed the effect of VPM and MS on erythroid differentiation. HDACi activities of the compounds were first assessed in Epo-stimulated TF1 cells for 24 h. Cells were treated with 0.5 and 1 mM VPA, 1 mM VPM, and 0.1 μM MS. The pan-HDACi SAHA was used as a positive control. Acetylated histone H4 (Ac-H4) and total H4 expression analysis revealed that 0.5 and 1 mM VPA as well as MS induced histone H4 acetylation, while VPM had no effect (Fig. 7A). The evaluation of cell viability showed that under these conditions, VPM and MS had a minor effect, with approximately 80% viable TF1 cells after 72 h of treatment and displayed a cytostatic effect (Fig. 7A).

The effect of VPM and MS was then evaluated on erythroid differentiation vs. VPA. The rate of hemoglobin-producing cells was assessed after 72 h of treatment with 1 mM VPM or 0.1 μM MS, and the percentage of benzidine-positive cells was reduced from 30% in Epo-treated cells to 7% in VPM-treated cells, displaying a similar inhibitory effect as 1 mM VPA. Conversely, MS had no effect on Epo-mediated hemoglobinization (Fig. 7B). In a similar way, flow cytometry analysis showed that VPA and VPM induced a decrease in GPA expression, while MS induced a significant increase compared with Epo-treated cells (Fig. 7B). The inhibitory effect of VPM on erythroid differentiation was confirmed in Acla-induced K562 cells as well as in Epo-stimulated HSCs. Indeed, VPM completely prevented Acla- and Epo-mediated hemoglobinization of both cell models and reduced GPA expression by 50% in HSCs, while VPM reduced HSCs viability by only 20% (Fig. 7C). To assess the effects of VPM and MS at the molecular level, we analyzed GATA-1 expression as well as γ-globin and miR-144/451 as GATA-1-dependent genes in Epo/TF1 and Acla-induced K562 cells. The results showed that VPA and VPM treatments of Epo/TF1 cells decreased and abolished γ-globin expression, respectively, while MS treatment had no effect. VPM inhibited GATA-1 expression in Epo/TF1 and Acla-induced K562 cells, while MS induced a 1.8-fold increase in its expression after 48 h in Epo/TF1 cells (Fig. 7D). Expression of miR-144/451 was decreased in Epo/TF1 cells treated with VPM for 48 h, whereas MS induced an increase. In the same

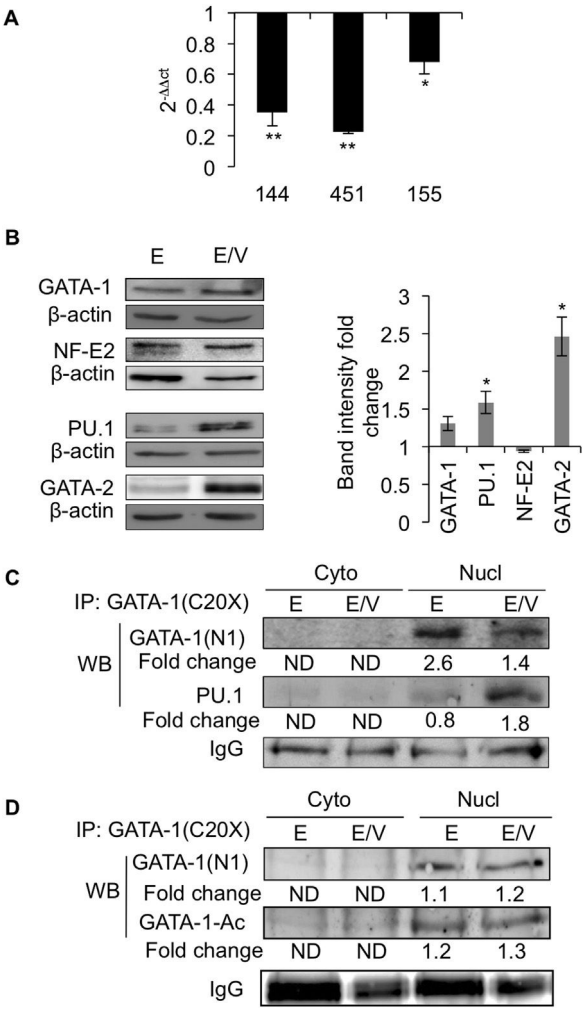


Fig. 5. VPA inhibits erythroid differentiation, promotes GATA-1/PU.1 interaction, and down-regulates miR expression in Epo-stimulated CD34$^+$/HSCs. Epo-stimulated CD34$^+$/HSCs were treated with 1 mM VPA "E/V" or left untreated "E" for 4 days. (A) Total RNA was extracted, and miR-144, -451, and -155 expression levels were analyzed by real-time PCR. The results were evaluated using the "$2^{-\Delta\Delta ct}$" method by normalizing to the small nuclear RNA RNU1A expression and to the control cells (untreated) as the average ± standard deviation of at least three independent experiments. (B) Expression levels of GATA-1, NF-E2, PU.1, and GATA-2 transcription factors were analyzed by western blot on nuclear extracts. β-Actin protein was used as loading controls. One experiment out of three independent experiments is shown. Band intensities were quantified and normalized according to β-actin. The band intensity obtained in control cells "E" was set as 1, and the relative fold change was determined and is shown as the mean ± the standard deviation of at least three independent experiments. (C, D) An immunoprecipitation (IP) assay for GATA-1 was performed on nuclear "nucl" and cytoplasmic "cyto" extracts using an anti-human GATA-1 (goat-C20X) antibody. GATA-1 expression was revealed using an anti-human GATA-1 (rat-N1)-specific antibody and an anti-rat horseradish-peroxidase-conjugated IgG as secondary antibody. (C) Co-immunoprecipitation of PU.1 was assessed using a PU.1-specific antibody, and (D) the acetylated form of GATA-1 "GATA-1-Ac" was revealed using an anti-acetyl-lysine antibody. In both cases, GATA-1 (C20X) antibody present in the eluate was revealed using an anti-goat IgG antibody "IgG" and used as loading control. One experiment out of three independent experiments is shown. The results are representative of at least three independent experiments and represent the mean ± standard deviation. $^{**}p < 0.01$ and $^{*}p < 0.05$.

way, Acla-induced expression of miR-144 and miR-451 was prevented by VPM (A/VPM) in K562 cells, and VPM alone triggered a decrease in the basal expression of miR-144/451 (Fig. 7E).

3.7. VPA does not inhibit megakaryocyte differentiation

As erythrocytes and megakaryocytes arise from a common hematopoietic progenitor and share many regulatory factors, we also investigated the effect of VPA on megakaryopoiesis. In this regard, we investigated the effect of VPA on the specific megakaryoblastic Meg-01 cell line. May Grünwald-Giemsa (MGG) staining showed that VPA induced large megakaryoblasts and basophilic megakaryocytes with enlarged nuclei and protoplasmic extensions, similar to TPA, which was used as a positive control. The quantification of differentiated cells showed that TPA and VPA induced differentiation in 32.5 and 23% of cells, respectively. VPA did not prevent TPA-induced megakaryocytic features but rather significantly increased the rate of differentiated cells by 10% compared with TPA treatment alone (Fig. 8A). Moreover, VPA induced a 1.7-fold increase in the megakaryocyte-specific marker CD61 after 72 h of treatment. The positive control TPA induced a 2.9-fold increase in CD61 expression (Fig. 8A). Cell viability remained at 80% after 72 h of VPA treatment, and cell growth was inhibited according to a cytostatic effect with an increase in cell proliferation by 1.7-fold in VPA-treated Meg-01 cells vs. 4.5-fold in control cells (Fig. 8B). Cell-cycle analysis confirmed a cytostatic effect with an accumulation of cells in G0/G1 phase in VPA-treated cells at 72 h (Fig. 8B).

At the molecular level, real-time PCR analysis of a panel of miRs showed that miR-27a, which is related to megakaryocyte differentiation though targeting RUNX1 mRNA, transiently increased as soon as 6 h. Similar to TF1, K562, and HSCs, VPA down-regulated miR-144 and miR-451 in Meg-01 cells after 6 h of treatment, while miR-221/222 remained unchanged (Fig. 8C). RUNX1 mRNA expression decreased in accordance with megakaryocyte program activation, and miR-27a increased in VPA-treated Meg-01 cells (Fig. 8D). In addition, GATA-1 expression was decreased at 24 h in accordance with miR-144/451 downregulation, while GATA-2 was increased at the same time (Fig. 8E).

To evaluate the ability of VPA to induce a switch from erythroid to megakaryocyte differentiation program in Epo-stimulated CD34$^+$/HSCs, we analyzed specific transcription factor expression in VPA-treated cells for 4 days. The results of western blot analysis showed that RUNX1 transcription factor expression was not modified under these conditions. Interestingly, ETS-1, Fli-1, and GABP-α expression levels clearly and significantly increased in correlation with the activation of megakaryocyte differentiation program (Fig. 8F).

4. Discussion

We demonstrate that VPA affects erythroid differentiation while promoting megakaryocytic features by modulating hematopoietic transcription factors and miR involved in the erythro-megakaryocyte differentiation pathway. Particularly, miR-144/451 was down-regulated in all erythroid and megakaryocytic models. This decrease was concomitant to decreased GATA-1 expression, a positive regulator of miR-144/451 gene transcription, by displacing GATA-2 from the promoter [23,46]. The expression level of miR-144/451 gene was increased by Epo in TF-1 cells in correlation with GATA-1 over-expression compared to GM-CSF stimulation. Acla-induced overexpression of GATA-1 in K562 cells [44,45] and mature miR-144 and miR-451 expression levels were also increased. VPA prevented this effect in correlation with the decrease of GATA-1 expression, as previously described [11]. Accordingly, VPA exerts its inhibitory activity on GATA-1 and miR-144/451 gene expression independent of the Epo/EpoR signaling pathway. Pre-miR-144 was affected similarly as mature miRs evidencing that VPA acts at the transcriptional level and upstream of miR-144/451 processing, most likely through GATA-1 down-regulation. Nevertheless, processing of miR-144 and miR-451 displays differences regarding argonaute (Ago)-2 and DICER involvement. The Ago-2 protein is crucial for erythroid differentiation, since deficient mice present severe abnormalities in erythropoiesis [47]. In contrast to miR-144,

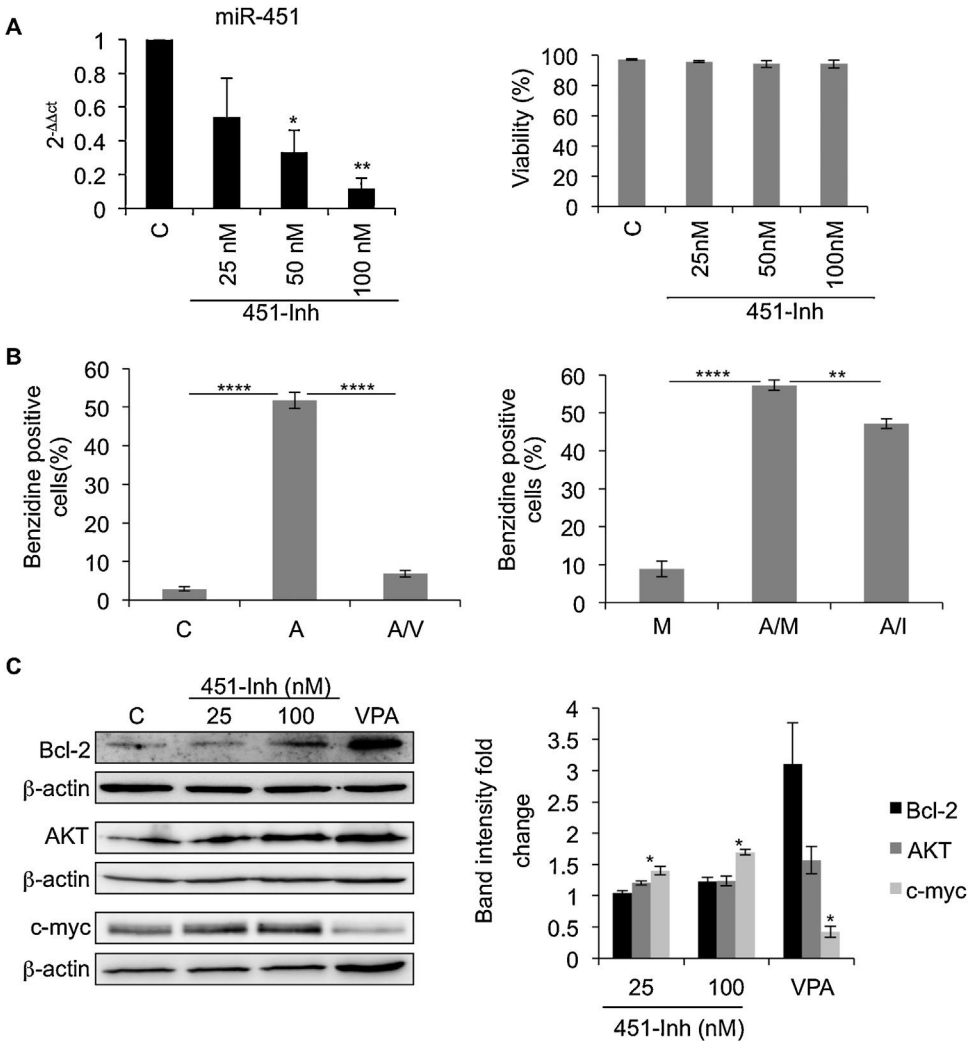


Fig. 6. Inhibition of miR-451 contributes to VPA-mediated deficiency of erythroid cells. (A) K562 cells were transfected with the indicated concentrations of anti-hsa-mir-451-inhibitor (451-Inh) for 24 h. Detectable miR-451 levels was determined by real-time PCR and evaluated using the $2^{-\Delta\Delta ct}$ method by normalizing to small nuclear RNA RNU1A expression and to the control cells "C", as the average ± standard deviation of at least three independent experiments (left panel). The effect of the same panel of 451-Inh concentrations on cell viability was analyzed by Trypan blue exclusion (right panel). (B) K562 cells were induced to differentiate with 10 nM Acla "A" for 3 days, and the effect of VPA on differentiation "A/V" was assessed by benzidine staining (left panel). K562 cells were transfected with 100 nM 451-Inh or were mock transfected "M" and induced to differentiate by Acla "A/I" and "A/M" for 3 days. The rate of hemoglobin-producing cells was evaluated by benzidine staining in the different conditions (right panel). (C) K562 cells were transfected with the indicated concentrations of 451-Inh or treated with 1 mM VPA for 24 h. miR-451 targets the mRNAs of Bcl-2, AKT, and c-myc, and the corresponding protein expression levels were analyzed by western blot. β-Actin protein was used as a loading control. One experiment out of three independent experiments is shown. Band intensities were quantified and normalized to β-actin. The band intensity obtained in control cells "C" was set as 1, and the relative fold change was determined and shown as the mean ± the standard deviation of at least three independent experiments. $^{****}p < 0.0001$, $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, and $^{*}p < 0.05$.

miR-451 processing is DICER-independent, while Ago-2 is clearly involved [48]. Results suggested that VPA could act through the modulation of miR-144/451 processing, since mature miRs expression levels were differently affected.

In VPA-treated Epo/CD34$^+$ HSCs, inhibition of erythroid differentiation and the decrease in miR-144/451 expression occurred despite a slight increase in GATA-1 expression. A similar effect was previously observed in TNFα-mediated inhibition of erythropoiesis [37,49,50]. In correlation with the inhibition of differentiation in CD34$^+$/HSCs, VPA induced over-expression of GATA-2 and PU.1 transcription factors that negatively regulate erythropoiesis [14,51]. Moreover, increased PU.1 expression was in agreement with a down-regulation of miR-155 in VPA-treated Epo/CD34$^+$ cells [52,53]. In addition, VPA promoted the GATA-1/PU.1 interaction in CD34$^+$ cells, which can explain miR-144/451 down-regulation [15,54] and the increase in GATA-2 expression despite the remaining GATA-1 expression level [16]. On the other hand, GATA-1 acetylation by CBP/P300 has been reported and directly related to GATA-1 transcriptional activity [55,56]. Accordingly, the acetylation status of GATA-1 was not increased by the HDAC inhibitor VPA, suggesting that GATA-1 transcriptional activity was not enhanced in VPA-treated Epo/CD34$^+$ cells.

Concerning the role of miR-451 in erythropoiesis, a study reported that miR-451-knockout mice displayed only a subtle anemia [48]. Our results were in agreement with this observation. Inhibition of miR-451 overexpression in Acla-induced K562 cells using the anti-hsa-mir-451-inhibitor (451-Inh) significantly prevented the induction of K562 cells hemoglobinization but the effect was much lower than that of VPA. This difference can be explained because VPA treatment abrogates GATA-1 expression leading to a strong down-regulation of erythroid-specific genes, whereas the directed inhibition of miR-451 by 451-inh is partially biased by the remaining GATA-1 overexpression. Therefore, VPA-mediated inhibition of GATA-1 is mainly directly responsible for the differentiation defect and the consecutive decrease in miR-144/451 level is likely to be partially involved. The impact of VPA-mediated

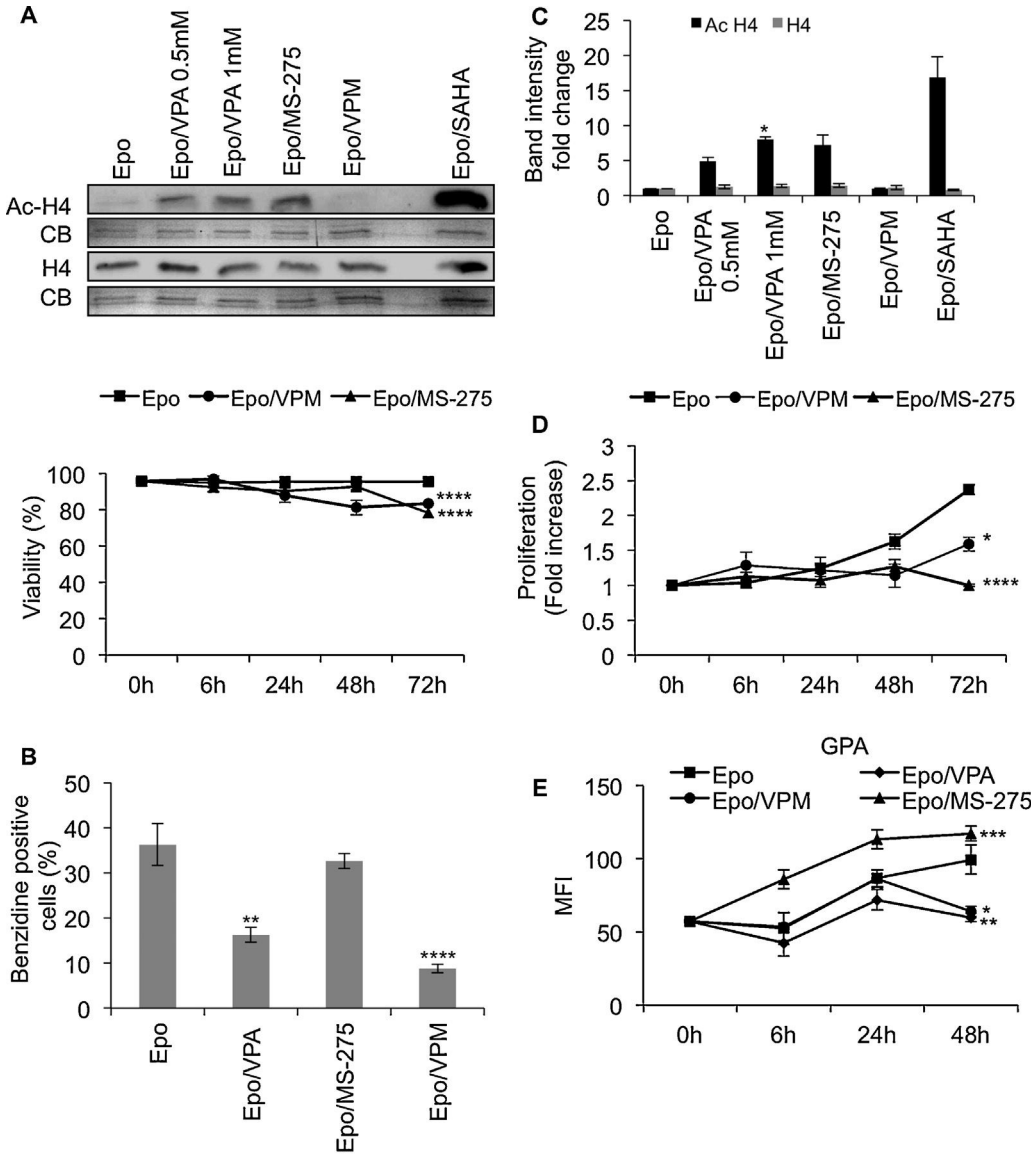


Fig. 7. HDACi activity of VPA is not required for erythropoiesis inhibition. (A) TF1 cells were treated with 0.5 and 1 mM VPA, 1 mM VPM, and 0.1 μM MS-275 for 24 h. SAHA 1 μM was used as a positive control for histone H4 acetylation status. Acid extraction of histones was performed, and expression of acetylated histone H4 (Ac-H4) and total histone H4 "H4" was evaluated by western blot analysis. Coomassie blue staining "CB" of proteins was used as a loading control. Band intensities were quantified and normalized according to Coomassie blue-stained bands. The band intensities obtained in control cells "Epo" was set as 1, and the relative fold change was determined and is shown as the mean ± the standard deviation of at least three independent experiments. Cell proliferation and cell viability were assessed in VPM- and MS-275-treated Epo/TF1 cells at the indicated times. (B) The effect of VPA, VPM, and MS-275 was evaluated on erythroid differentiation in Epo-stimulated TF1 cells by benzidine staining after 72 h and by flow cytometry analysis of GPA expression at the indicated times. (C) The effect of VPM was evaluated on erythroid differentiation in Acla-treated K562 cells by benzidine staining after 72 h and in Epo-simulated HSCs by benzidine staining and flow cytometric analysis of GPA expression. Cell viability was evaluated in Epo/HSCs treated with VPM 1 mM for 4 days. (D) Western blot analyses of γ-globin expression in Epo-stimulated TF1 cytoplasmic extracts after 48 h of VPA, VPM and MS-275 treatments. GATA-1 expression analysis on nuclear extracts was performed in VPM- and MS-275-treated Epo/TF1 cells at 48 h. GATA-1 expression analysis on nuclear extracts was performed in Acla- and Acla/VPM-treated K562 cells for 72 h. (E) Total RNA was extracted from Epo/TF1 cells after 48 h of VPM or MS-275 treatment and from K562 cells after 72 h of Acla "A", "A/VPM", or VPM treatment. Real-time PCR analysis of miR-144 and miR-451 expression was performed, and the results were evaluated using the "$2^{-\Delta\Delta ct}$" method by normalizing to the small nuclear RNA RNU1A expression and to the control cells (untreated), as the average ± standard deviation of at least three independent experiments. In western blots, β-actin was used as a loading control. One experiment out of three independent experiments is shown. Band intensities were quantified and normalized to β-actin. The band intensity obtained in control cells was set as 1, and the relative fold change was determined and shown as the mean ± the standard deviation of at least three independent experiments. $^{****}p < 0.0001$, $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, and $^{*}p < 0.05$. $^{\$\$\$}p < 0.001$, $^{\$\$}p < 0.01$ versus Acla-treated cells "A".

inhibition of miR-451 was assessed in K562 cells by analyzing proteins whose mRNAs are targeted by miR-451 (Bcl2, AKT, and c-myc) [24–27]. All target proteins were overexpressed in 451-Inh transfected control cells, while VPA-mediated down-regulation of the GATA-1/miR-144/451 axis impacted AKT and Bcl2 proteins but not c-myc. This suggested that VPA is able to impact cellular processes in erythroid cells through miR-144/451. However, c-myc regulation escapes miR-451 down-regulation, suggesting an alternative mechanism, possibly through the down-regulation of c-myc transcription as previously reported [57]. On the other hand, VPA-mediated increase of Bcl2 and decrease of c-myc are in accordance with the cytostatic effect observed. Induction of the anti-apoptotic Bcl-2 protein could then contribute to cell survival, while decreased c-myc could block cell division. The cytostatic effect of VPA could match with the induction of other differentiation pathways, likely the megakaryocyte and myeloid pathways, as previously reported [11,38,39]. However, VPA has no cytostatic effect on Epo-stimulated HSC and this result could be explained by the fact that primary

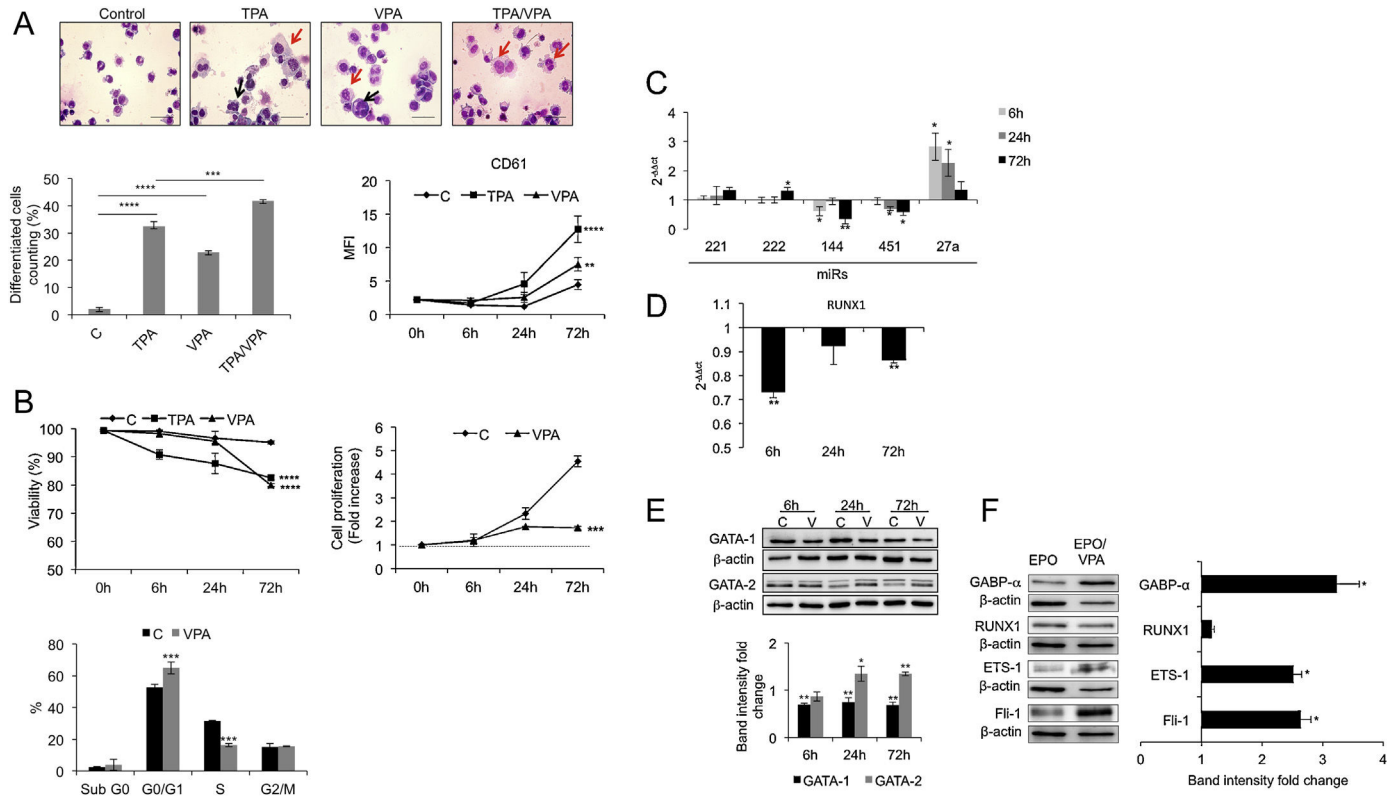


Fig. 8. VPA does not inhibit the megakaryocytic pathway. VPA effects were assessed in Meg-01 cells. (A) Megakaryocyte features were evaluated in Meg-01 cells treated or not with 1 mM VPA or 100 nM TPA. May Grünwald-Giemsa (MGG) staining was performed after 72 h of the indicated treatments. Untreated cells were used as the control. Images were captured using a 20× objective. The horizontal scale bar in each picture represents 50 μm. The black arrows show megakaryoblasts (megakaryocytes stage I), and the red arrows show basophilic megakaryocytes (megakaryocyte stage II). The percentage of differentiated cells was evaluated according to morphological changes in treated cells vs. control cells. Expression of the megakaryocyte specific marker CD61 was analyzed by flow cytometry at the indicated times and expressed as the mean of fluorescence intensity (MFI). (B) The effect of VPA and TPA on cell viability at the indicated concentrations and times was evaluated in Meg-01 cells by Trypan blue staining. Meg-01 cell proliferation was evaluated during a culture time course with or without 1 mM VPA treatment at the indicated times. Cell proliferation was expressed as the fold change of the cell number at each time point relative to 0 h. Cell-cycle analysis was performed by propidium iodide staining and flow cytometry after 72 h of VPA treatment. (C) Meg-01 cells were treated with VPA for 6, 24, and 72 h or left untreated. Total RNA was extracted, and the indicated miR expression levels were measured by real-time PCR analysis. (D) RUNX1 mRNA expression was analyzed using the same total RNA extracts from VPA-treated Meg-01 cells. Real-time PCR results were evaluated using the "$2^{-\Delta\Delta ct}$" method, by normalizing to the small nuclear RNA RNU1A (for miR) and β-actin (for RUNX1) expression at each time point and to the control cells (untreated) at each time point as the average ± standard deviation of at least three independent experiments. (E) GATA-1 and GATA-2 proteins expression levels were analyzed in control "C" and VPA "V"-treated Meg-01 cells for the indicated times by western blot. Band intensities were quantified. (F) GABP-α, RUNX1, ETS-1, and Fli-1 protein expression levels were analyzed in Epo- and Epo/VPA-treated CD34$^+$/HSCs for 4 days by western blot. Band intensities were quantified. β-Actin was used as loading controls. One experiment out of three independent experiments is shown. Band intensities were quantified and normalized according to β-actin. The band intensity obtained in control cells was set as 1 and the relative fold change was determined and shown as the mean ± the standard deviation of at least three independent experiments. ****$p < 0.0001$, ***$p < 0.001$, **$p < 0.01$, and *$p < 0.05$.

healthy cells are less sensitive to apoptosis induced by VPA compared to tumor cells or CLL [58,59].

Because erythrocytes and megakaryocytes arise from common myeloid progenitors and share common regulatory factors, we investigated the effect of VPA on the megakaryocyte pathway. We previously reported that VPA did not affect or activate megakaryocyte markers in different cell models [11]. As erythroleukemia TF1 and K562 cell lines are erythroid models with low potential of megakaryocyte differentiation, we chose to investigate the effect of VPA with the specific megakaryoblastic Meg-01 cell line. VPA-induced megakaryocyte features in Meg-01 cells, including morphological changes and CD61 expression, occurred with a transient increase in miR-27a. MiR-27a is involved in megakaryocytic development by down-regulating RUNX1 gene expression [30] and RUNX1 mRNA expression was down-regulated by VPA. Besides miR-27a/RUNX1 axis, VPA modulated the micro-network linking GATA-1/GATA-2 and miR-27a. GATA-1 overexpression activates miR-27a expression at later stages of erythropoiesis, while GATA-2 was reported to repress miR-27a gene expression in early erythroid progenitors. Our results in Meg-01 cells show that GATA-2 was up-regulated after 24 h in parallel to the decrease in miR-27a expression. However, miR-27a expression remained higher than in control cells, in agreement with megakaryocyte differentiation while its overexpression at 6 h of treatment cannot be explained through GATA-1 expression levels. Conversely, down-regulation of GATA-1 protein correlated with the decrease in miR-144/451 expression levels as in erythroid models. These data supported the finding that VPA affects the erythro-megakaryocyte differentiation pathway through the modulation of GATA-1 and GATA-2, which display lineage-specific expression levels [46] and interplay with miRs. In Epo-stimulated CD34$^+$/HSCs, we show that VPA activates the expression of ETS family transcription factors, namely ETS-1, Fli-1, and GABP-alpha, besides PU.1, in accordance with erythropoiesis inhibition and the potential activation of megakaryocyte differentiation. Fli-1 is a positive regulator of megakaryopoiesis [35], whereas it was reported as playing a negative regulatory role during differentiation of erythroid cells [33]. GABPα activates the transcription of genes specifically expressed in early stages of megakaryopoiesis, including αIIb and c-mpl [36]. ETS-1 is overexpressed along megakaryocyte development and triggers megakaryocyte differentiation but inhibits erythropoiesis of CD34$^+$/HSCs [34]. Up-regulation of ETS-1 was also in accordance with miR-155 decrease in VPA-treated CD34$^+$/HSCs, which is highly expressed in CD34$^+$ hematopoietic progenitors. Its

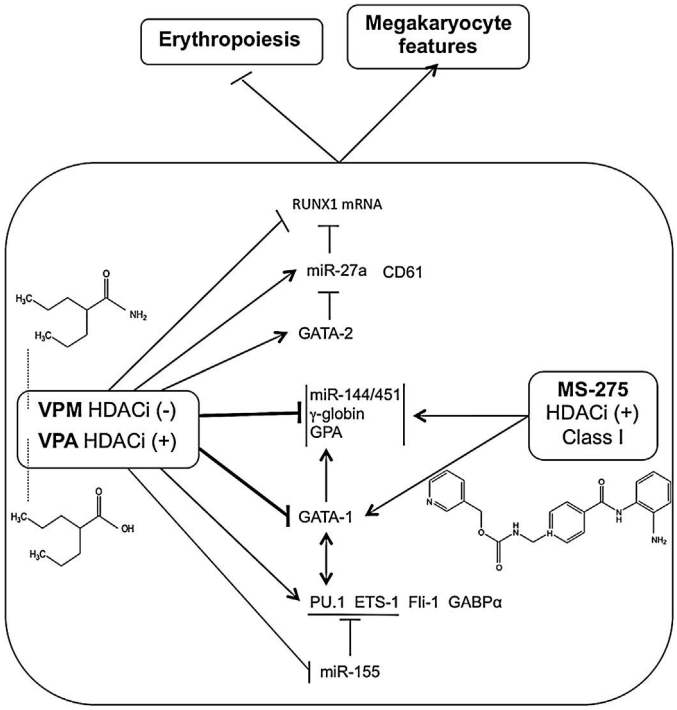


Fig. 9. VPA modulates micro-networks of regulation in erythro-megakaryocyte program. VPA as well as its analog VPM lacking HDACi activity inhibited erythroid differentiation resulting in the down-regulation of GPA, γ-globin, and miR-144/451 in correlation with the inhibition of GATA-1 expression (bold arrows). In contrast, the Class I HDAC inhibitor MS-275 (MS) did not inhibit erythroid differentiation, which was in accordance with GPA, γ-globin as well as miR-144/451 up-regulation and GATA-1 increased expression. VPA induced the expression of ETS family of transcription factors (PU.1, ETS-1, GABP-α, Fli-1) in CD34$^+$/HSCs, which are described as negative regulators of erythropoiesis while promoting the megakaryocyte pathway. Notably, PU.1 and ETS-1 were increased in correlation with miR-155 downregulation and the PU.1/GATA-1 interaction was stimulated by VPA. Over-expression of GATA-2 was also observed in the megakaryocyte model Meg-01 cell line. VPA induced megakaryocyte features such as CD61 marker and the miR-27a in correlation with RUNX1 mRNA down-regulation. VPA is then able to modulate regulatory factors playing major roles in erythro-megakaryocyte differentiation pathway, including transcription factors and miRNAs, forming regulatory micro-networks.

expression decreases during megakaryopoiesis since it alters megakaryocyte proliferation and differentiation and decreases the expression of its target, ETS-1 [29]. On the other hand, it has been shown that VPA generates megakaryocytic precursors in the presence of IL3/SCF [60], corresponding to our experimental conditions. Altogether, results show that VPA acts on the erythro-megakaryocyte balance through modulating common and specific transcription factors and miR expression levels.

Whether HDACi activity is involved in the effects of VPA was not obvious. VPA treatment of *Xenopus laevis* during gastrulation led to a complete absence of red blood cells [61] and VPA induced megakaryocyte differentiation of UT-7 cells [39]. In these specific cases, the effect of VPA was dependent on its HDACi activity. However, besides HDACi properties, VPA displays further mechanisms of action and the ability of numerous HDACis to modulate hematopoietic cell differentiation never provided obvious relationship between HDACi activity and differentiation. Some HADCi were shown to induce γ-globin gene expression in vivo [62], while trichostatin A (TSA) inhibits erythroblast nuclear condensation and extrusion [63]. Panobinostat (LBH589), an HDACi with promising anti-cancer activities, impairs megakaryocyte maturation and platelet formation [64]. VPA primarily inhibits Class I and to a lesser extent Class II HDACs [3,38]. We observed that 0.5 and 1 mM VPA had HDACi activities, while only 1 mM VPA inhibited erythroid features. This result strongly suggested that HDACi activity of VPA on class I and II HDACs was not responsible for this specific effect. VPM is classically used as a negative HDACi control [61], was able to prevent erythroid differentiation, whereas the Class I HDACs inhibitor MS-275 did not trigger down-regulation of erythroid markers and even led to their induction. Accordingly, MS-275 has been reported as an inducer of γ-globin expression [65]. Therefore, the epigenetic activity of VPA was not required to prevent erythroid differentiation and other mechanisms of action should be involved and investigated.

Overall, we show here that VPA inhibits the erythroid program while promoting megakaryocytic features through the modulation of micro-networks involving GATA and ETS transcription factors and miRs essential for erythro-megakaryocyte differentiation. Our results indicate that the HDACi activity of VPA, which mainly leads to Class I HDAC inhibition, is not required for its ability to inhibit erythropoiesis in all our three human cell models (Fig. 9). In conclusion, the effects of VPA on erythropoiesis and hematopoiesis should be considered for its use in cancer patients particularly susceptible to anemia.

Acknowledgments

The authors thank C. Groos for helpful comments and the staff of the Clinique Bohler for collecting cord blood. A.T. and A.G. are recipients of doctoral and post-doctoral Télévie grants, respectively. M.S. was supported by a "Waxweiler Grant for Cancer Prevention Research" from the Action Lions "Vaincre le Cancer". The Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) is financially supported by "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. M.D. was supported by the National Research Foundation (NRF) by the MEST of Korea for Tumor Microenvironment Global Core Research Center (GCRC) grant [grant number 2012-0001184].

References

[1] Mesdjian E, Ciesielski L, Valli M, Bruguerolle B, Jadot G, Bouyard P, et al. Sodium valproate: kinetic profile and effects on GABA levels in various brain areas of the rat. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 1982;6:223–33.
[2] VanDongen AM, VanErp MG, Voskuyl RA. Valproate reduces excitability by blockage of sodium and potassium conductance. Epilepsia 1986;27:177–82.
[3] Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. EMBO J 2001;20:6969–78.
[4] Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. J Biomed Biotechnol 2010;2010.
[5] Chateauvieux S, Morceau F, Diederich M. Valproic Acid. In: Wexier P, editor. Encyclopedia of Toxicology. 3rd ed, Academic Press: Elsevier; 2014. p. 905–8.
[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.
[7] Gerstner T, Teich M, Bell N, Longin E, Dempfle CE, Brand J, et al. Valproate-associated coagulopathies are frequent and variable in children. Epilepsia 2006;47:1136–43.
[8] 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.
[9] 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.
[10] The T, Kolla R, Dawkins F, Trouth 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.
[11] Chateauvieux S, Eifes S, Morceau F, Grigorakaki C, Schnekenburger M, Henry E, et al. Valproic acid perturbs hematopoietic homeostasis by inhibition of erythroid differentiation and activation of the myelo-monocytic pathway. Biochem Pharmacol 2011;81:498–509.
[12] Chateauvieux S, Grigorakaki C, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. Biochem Pharmacol 2011;82:1291–303.

[13] Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. Mol Cell Biol 2005;25:1215–27.
[14] Morceau F, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M. GATA-1: friends, brothers, and coworkers. Ann NY Acad Sci 2004;1030:537–54.
[15] 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.
[16] 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.
[17] 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.
[18] Huang Z, Dore LC, Li Z, Orkin SH, Feng G, Lin S, et al. GATA-2 reinforces megakaryocyte development in the absence of GATA-1. Mol Cell Biol 2009;29:5168–80.
[19] Morceau F, Chateauvieux S, Gaigneaux A, Dicato M, Diederich M. Long and short non-coding RNAs as regulators of hematopoietic differentiation. Int J Mol Sci 2013;14:14744–70.
[20] Havelange V, Garzon R. MicroRNAs: emerging key regulators of hematopoiesis. Am J Hematol 2010;85:935–42.
[21] Zhang L, Sankaran VG, Lodish HF. MicroRNAs in erythroid and megakaryocytic differentiation and megakaryocyte-erythroid progenitor lineage commitment. Leukemia 2012;26:2310–6.
[22] Bianchi N, Zuccato C, Finotti A, Lampronti I, Borgatti M, Gambari R. Involvement of miRNA in erythroid differentiation. Epigenomics 2012;4:51–65.
[23] Dore LC, Amigo JD, Dos Santos CO, Zhang Z, Gai X, Tobias JW, et al. A GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis. Proc Natl Acad Sci USA 2008;105:3333–8.
[24] Li HY, Zhang Y, Cai JH, Bian HL. MicroRNA-451 inhibits growth of human colorectal carcinoma cells via downregulation of Pi3k/Akt pathway. Asian Pac J Cancer Prev 2013;14:3631–4.
[25] Nan Y, Han L, Zhang A, Wang G, Jia Z, Yang Y, et al. MiRNA-451 plays a role as tumor suppressor in human glioma cells. Brain Res 2010;1359:14–21.
[26] Li HP, Zeng XC, Zhang B, Long JT, Zhou B, Tan GS, et al. miR-451 inhibits cell proliferation in human hepatocellular carcinoma through direct suppression of IKK-beta. Carcinogenesis 2013;34:2443–51.
[27] Li X, Sanda T, Look AT, Novina CD, von Boehmer H. Repression of tumor suppressor miR-451 is essential for NOTCH1-induced oncogenesis in T-ALL. J Exp Med 2011;208:663–75.
[28] Thompson RC, Herscovitch M, Zhao I, Ford TJ, Gilmore TD. NF-kappaB down-regulates expression of the B-lymphoma marker CD10 through a miR-155/PU.1 pathway. J Biol Chem 2011;286:1675–82.
[29] Romania P, Lulli V, Pelosi E, Biffoni M, Peschle C. Marziali G. MicroRNA 155 modulates megakaryopoiesis at progenitor and precursor level by targeting Ets-1 and Meis1 transcription factors. Br J Haematol 2008;143:570–80.
[30] Ben-Ami O, Pencovich N, Lotem J, Levanon D, Groner Y. A regulatory interplay between miR-27a and Runx1 during megakaryopoiesis. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106:238–43.
[31] Brioschi M, Fischer J, Cairoli R, Rossetti S, Pezzetti L, Nichelatti M, et al. Down-regulation of microRNAs 222/221 in acute myelogenous leukemia with deranged core-binding factor subunits. Neoplasia 2010;12:866–76.
[32] Wang F, Zhu Y, Guo L, Dong L, Liu H, Yin H, et al. A regulatory circuit comprising GATA1/2 switch and microRNA-27a/24 promotes erythropoiesis. Nucleic Acids Res 2014;42:442–57.
[33] Athanasiou M, Mavrothalassitis G, Sun-Hoffman L, Blair DG. FLI-1 is a suppressor of erythroid differentiation in human hematopoietic cells. Leukemia 2000;14:439–45.
[34] Dore LC, Chlon TM, Brown CD, White KP, Crispino JD. Chromatin occupancy analysis reveals genome-wide GATA factor switching during hematopoiesis. Blood 2012;119:3724–33.
[35] Hart A, Melet F, Grossfeld P, Chien K, Jones C, Tunnacliffe A, et al. Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygously deleted in patients with thrombocytopenia. Immunity 2000;13:167–77.
[36] Pang L, Xue HH, Szalai G, Wang X, Wang Y, Watson DK, et al. Maturation stage-specific regulation of megakaryopoiesis by pointed-domain Ets proteins. Blood 2006;108:2198–206.
[37] 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.
[38] 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.
[39] 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.
[40] Chen X, Radany EH, Wong P, Ma S, Wu K, Wang B, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid induces hypersensitivity to radiation therapy in acute myelogenous leukemia cells expressing constitutively active FLT3 mutants. PLoS One 2013;8:e84515.
[41] Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. Nucleic Acids Res 1989;17:6419.
[42] Nunes MJ, Milagre I, Schnekenburger M, Gama MJ, Diederich M, Rodrigues E. Sp proteins play a critical role in histone deacetylase inhibitor-mediated derepression of CYP46A1 gene transcription. J Neurochem 2010;113:418–31.
[43] Trecul A, Morceau F, Gaigneaux A, Orsini M, Chateauvieux S, Grandjenette C, et al. Polyphenol tri-vanillic ester 13c inhibits P-JAK2V617F and Bcr-Abl oncokinase expression in correlation with STAT3/STAT5 inactivation and apoptosis induction in human leukemia cells. Cancer Lett 2013;340:30–42.
[44] Morceau F, Aries A, Lahlil R, Devy L, Jardillier JC, Jeannesson P, et al. Evidence for distinct regulation processes in the aclacinomycin- and doxorubicin-mediated differentiation of human erythroleukemic cells. Biochem Pharmacol 1996;51:839–45.
[45] Morceau F, Chenais B, Gillet R, Jardillier JC, Jeannesson P, Trentesaux C. Transcriptional and posttranscriptional regulation of erythroid gene expression in anthracycline-induced differentiation of human erythroleukemic cells. Cell Growth Differ 1996;7:1023–9.
[46] Bresnick EH, Lee HY, Fujiwara T, Johnson KD, Keles S. GATA switches as developmental drivers. J Biol Chem 2010;285:31087–93.
[47] O'Carroll D, Mecklenbrauker I, Das PP, Santana A, Koenig U, Enright AJ, et al. A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway. Genes Dev 2007;21:1999–2004.
[48] Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. Nature 2010;465:584–9.
[49] 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.
[50] 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.
[51] Lowry JA, Mackay JP. GATA-1: one protein, many partners. Int J Biochem Cell Biol 2006;38:6–11.
[52] Martinez-Nunez RT, Louafi F, Friedmann PS, Sanchez-Elsner T. MicroRNA-155 modulates the pathogen binding ability of dendritic cells (DCs) by down-regulation of DC-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin (DC-SIGN). J Biol Chem 2009;284:16334–42.
[53] Vigorito E, Perks KL, Abreu-Goodger C, Bunting S, Xiang Z, Kohlhaas S, et al. microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. Immunity 2007;27:847–59.
[54] 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.
[55] Boyes J, Byfield P, Nakatani Y, Ogryzko V. Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. Nature 1998;396:594–8.
[56] Hung HL, Lau J, Kim AY, Weiss MJ, Blobel GA. CREB-Binding protein acetylates hematopoietic transcription factor GATA-1 at functionally important sites. Mol Cell Biol 1999;19:3496–505.
[57] 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.
[58] Armeanu S, Pathil A, Venturelli S, Mascagni P, Weiss TS, Gottlicher M, et al. Apoptosis on hepatoma cells but not on primary hepatocytes by histone deacetylase inhibitors valproate and ITF2357. J Hepatol 2005;42:210–7.
[59] 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.
[60] Liu B, Ohishi K, Yamamura K, Suzuki K, Monma F, Ino K, et al. A potential activity of valproic acid in the stimulation of interleukin-3-mediated megakaryopoiesis and erythropoiesis. Exp Hematol 2010;38:685–95.
[61] Shah RR, Koniski A, Shinde M, Blythe SA, Fass DM, Haggarty SJ, et al. Regulation of primitive hematopoiesis by class I histone deacetylases. Dev Dyn 2013;242:108–21.
[62] Cao H, Jung M, Stamatoyannopoulos G. Hydroxamide derivatives of short-chain fatty acid have erythropoietic activity and induce gamma gene expression in vivo. Exp Hematol 2005;33:1443–9.
[63] Popova EY, Krauss SW, Short SA, Lee G, Villalobos J, Etzell J, et al. Chromatin condensation in terminally differentiating mouse erythroblasts does not involve special architectural proteins but depends on histone deacetylation. Chromosome Res 2009;17:47–64.
[64] Iancu-Rubin C, Gajzer D, Mosoyan G, Feller F, Mascarenhas J, Hoffman R. Panobinostat (LBH589)-induced acetylation of tubulin impairs megakaryocyte maturation and platelet formation. Exp Hematol 2012;40:564–74.
[65] Cao H, Stamatoyannopoulos G. Histone deacetylase inhibitor FK228 is a potent inducer of human fetal hemoglobin. Am J Hematol 2006;81:981–3.

Cancer Letters 340 (2013) 30–42

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Cancer Letters

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

Polyphenol tri-vanillic ester 13c inhibits P-JAK2V617F and Bcr–Abl oncokinase expression in correlation with STAT3/STAT5 inactivation and apoptosis induction in human leukemia cells

Anne Trécul [a], Franck Morceau [a], Anthoula Gaigneaux [a], Marion Orsini [a], Sébastien Chateauvieux [a], Cindy Grandjenette [a], Mario Dicato [a], Marc Diederich [b,*]

[a] Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, 9, Rue Edward Steichen, 2540 Luxembourg, Luxembourg
[b] Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 April 2013
Received in revised form 17 June 2013
Accepted 20 June 2013

Keywords:
Kinase
JAK2
Bcr–Abl
13c
Polyphenol
STAT

ABSTRACT

Constitutive activity of kinases has been reported in many types of cancers, so that inhibition of "onco-kinases" became a validated anti-cancer strategy. We found that the polyphenol 13c, a tri-vanillate derivative, inhibited kinase phosphorylation in leukemia cells. P-JAK2, P-Src and P-PI3Kp85 inhibition occurred independently of phosphatase involvement in JAK2V617F expressing HEL cells while 13c inhibited Bcr–Abl expression without inhibition of phosphorylation in chronic myelogenous leukemia cell lines (K562, MEG-01). In correlation with kinase inhibition, 13c abolished constitutive P-STAT3/P-STAT5 expression, down-regulated Mcl-1 and c-Myc gene expression and induced apoptosis. Altogether, polyphenol 13c displays potential antitumor activities by affecting onco-kinases and STAT activities.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Polyphenols are widely present in the vegetal kingdom as the products of the secondary metabolism of plants. Many studies have shown their potentialities as chemopreventive and anticancer agents as well as for the treatment of cardiovascular, inflammatory and neurodegenerative diseases [1]. Based on anticancer activities of vanillin, Lamoral-Theys et al. reported the cytostatic effect of a series of vanillate derivatives on several cancer cell lines in comparison to curcumin, a well known divanillate-based polyphenol for its anti-inflammatory and chemopreventive properties [2]. Among 33 di- and trivanillate based polyphenol compounds studied, the authors reported that the tri-chloro derivative of trivanillic ester 13c, displayed one of the most potent *in vitro* antitumor activity. Besides cytostatic properties, 13c showed potent inhibitory activity of protein kinases in an *in vitro* kinase assay [3].

Many cancers express constitutively active kinases including Src (sarcoma viral oncogene homolog), JAK (Janus Kinase), Bcr–Abl (breakpoint cluster region-Abelson) and EGFR (epidermal growth factor receptor) [4,5]. Indeed, permanent activation of onco-kinases leads to upregulation of genes involved in cell cycle and survival including cyclins, c-Myc, Bcl-xL and Mcl-1 among others [5,6] through the constitutive activation of transcription factors including Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT). Inhibition of constitutive activities and permanent phosphorylation status of tyrosine kinases is a promising therapeutic pathway as revealed by Imatinib/Gleevec for example. Moreover, inactivation of STAT3 in cancer cells is recognized as a promising strategy to be associated to anticancer therapies. Many synthetic and natural P-STAT3 inhibitors have been described *in vitro*, while no clinical studies have been published to date [7].

In physiological conditions, JAK2 activation results from erythropoietin (EPO)-, interleukine (IL)6-, IL10- or interferon (IFN)-gamma receptor stimulation. The mutated form of JAK2, namely JAK2*V617F* is observed in 95% of patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms, polycythemia vera and essential thrombocythemia and myelofibrosis [8–11]. This mutation makes the kinase hypersensitive or independent of hematopoietic cytokines. The substitution V617F is located within the Jak homology 2 (JH2) domain of the protein, which is a pseudokinase. JH2 domain regulates associated receptor phosphorylation through auto-inhibitory properties, which are abolished in the mutated protein. Consequently, mutated JAK2 continuously activates signaling pathways including PI3K/AKT, ERK/MAPK pathways and

* Corresponding author. Tel.: +82 2 880 8919.
E-mail address: marcdiederich@snu.ac.kr (M. Diederich).

0304-3835/$ - see front matter © 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.06.023

STAT transcription factors, in the absence of membrane receptor stimulation by the ligand [9]. Specifically, constitutive activation of STAT3 has been linked to tumor development and is now widely recognized as a cancer-promoting factor. Besides, several reports have shown that the PI3K/AKT pathway as well as the independent receptor kinase Src leads to STAT3 activation [12,13]. Moreover, STAT3 is frequently activated in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloid leukemia (AML) [14].

In this study we investigated the effect of 13c on constitutive phosphorylation of the protein kinase JAK2 in the human erythroleukemia (HEL) cell line expressing homozygous JAK2V617F protein. Furthermore we evaluated the effect of 13c on the oncogenic fusion protein kinase Bcr–Abl, which characterizes 90% of chronic myeloid leukemia cells (CML) [15]. Bcr-Ablp210 protein is the most frequent variant [16]. In contrast to constitutive kinase activity resulting from conformational modification in JAK2V617F, Bcr–Abl kinase activity results from a reciprocal chromosomal translocation t(9;22)(q34;q11) giving rise to the Philadelphia chromosome. Abl protein is a tyrosine kinase which autoregulates through Src-homology (SH)2–SH3 domains and myristoylation in the N-terminal region [17]. In Bcr–Abl protein the regulation site of the kinase is lost and tyrosine kinase activity becomes permanent [18] leading to constitutive activation of cell signaling pathways. In Bcr–Abl positive cells, constitutive activation of STAT factors, particularly phosphorylated (P)STAT5, which is the cause of initiation and maintenance of CML [19–21], would result from Bcr–Abl activity independently of JAK. Bcr–Abl-mediated activation by STAT could occur through SH2 domain as for Src [22]. Besides, STAT factors and target genes can be activated by Bcr–Abl through activation of PI3K/AKT and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways.

According to *in vitro* kinase assays, this work confirms the ability of the polyphenol 13c to inhibit kinase activities *in cellulo*. Constitutive expression of P-JAK2, P-Src and P-PI3K was inhibited at different tyrosine residues in HEL cells, in correlation with decreased STAT3 activation. Moreover, 13c inhibited Bcr–Abl expression in CML MEG-01 and K562 cells, while phosphorylation status in regulatory sites was not affected. However, P-ERK and P-STAT5 expressions were also inhibited. The expression of c-myc and Mcl-1 was downregulated in the different models in correlation with a decrease in cell proliferation and apoptosis induction.

2. Materials and methods

2.1. Cells, culture and treatments

All the cell lines, HEL (acute myeloid leukemia), A549 (lung adenocarcinoma), K562 and MEG-01 (chronic myelogenous leukemia) were obtained from Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany) and cultured in RPMI 1640 (Cambrex-Longa) containing 10% fetal calf serum (SCF) and 1% of a mixture of antibiotics (penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 μg/mL of Cambrex) and antifungal agents (amphotericin B 25 μg/mL). TF1cell line was grown in the presence of 5 ng/mL GM-CSF (PeproTechnology) or 10 U/mL recombinant erythropoietin (Eprex, Janssen-Cilag) in the culture medium. All cells were cultured in an incubator at 37 °C, 95% humidity and 5% CO_2. For suspension cells, medium was renewed every three days and the cells were resuspended at a concentration of 2×10^5 cells/mL. For A549 adherent cells, medium was renewed every two days and the cells were resuspended at a concentration of $1–2 \times 10^6$ cells per 80 cm^2. Cell viability was estimated by Trypan blue (Cambrex) staining.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were purified using Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Roosendaal, The Netherlands). PBMCs were isolated by density gradient centrifugation from freshly collected buffy coats obtained from healthy adult human volunteers (Red Cross, Luxembourg, Luxembourg). All healthy volunteers gave informed written consent. After isolation, cells were washed twice in 1X PBS and adjusted at 2×10^6 cells/mL in RPMI 1640 (supplemented with 1% antibiotic–antimycotic (Lonza) and 10% FCS (Lonza).

The tri-vanillate 13c was synthesized and purified as previously described [23]. Stattic (Santa Cruz) was used as a specific inhibitor of P-STAT3. Interferon (IFN)-γ (Sigma) 100 ng/mL and interleukin (IL)-6 (Sigma) 50 ng/mL were used as P-STAT3 inducers.

2.2. Hoechst reagent and propidium iodide

Hoechst 33342 (Calbiochem VWR International) at 1 μg/mL was added (3 μL) to 10^6 cells in RPMI. The mixture was incubated at 37 °C for 20 min. Then the cells were centrifuged at 350*g* for 5 min. Then 20 μL of propidium iodide (PI) (diluted to 1/500) were added to the cell pellet. The apoptotic or necrotic state of the cells was analyzed by fluorescence microscopy (Olympus inverted microscope Cell M).

2.3. Protein extractions

Total protein extracts were prepared from approximately 10^7 cells. Cells were lysed by vigorous stirring at 4 °C for 15 min in 250 μL of a mixture containing MPER lysis buffer (Mammalian Protein Extraction Reagent, Pierce, Belgium), a cocktail of protease inhibitors (Complete (Roche) and 1.65 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Sigma)) and phosphatase inhibitors (Phophostop (Roche), 4.1 mM sodium fluoride (NaF) and 0.8 mM ortho-vanadate (OV) (Sigma)). The homogenate was centrifuged 15 min at 18,000*g* at 4 °C.

Nuclear and cytoplasmic proteins were extracted from 5×10^6 to 10^7 cells as previously described according to Schreiber et al. [24]. Protein concentrations were determined by the Bradford method using BioRad reagent (BioRad Laboratories).

2.4. Western Blot

Ten to twenty micrograms of denatured protein extracts were resolved in a 10% SDS-polyacrylamide gel. Separated proteins were then transferred onto a PVDF membrane (GE Healthcare). The membranes were blocked in phosphate-buffered alkaline/0.1% Tween 20 (PBS-T) 1X, supplemented with 5% milk or 5% BSA according to the antibody manufacturer then probed with primary antibodies (STAT3/P-STAT3, STAT5/P-STAT5, Src/P-Src, JAK2/P-JAK2, PI3K/P-PI3K, AKT/P-AKT, ERK/P-ERK, Mcl-1, c-Myc, PTEN, SHP1, P-c-Abl, Caspase 7, Caspase 8, Caspase 9, (Cell Signaling, Leiden, The Netherlands), Bcl2, Tubulin-α (Calbiochem, Leuven, Belgium), PP2A, c-Abl, Caspase 3, Lamin B, NF-κB p50 and p65 (Santa Cruz Biotechnology, Tebu-Bio, Boechout, Belgium) and β-actin antibodies (Sigma)) and probed again with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Amersham Biosciences). Every step (membrane saturation and probing) was followed by three washes in PBS-T. The immunoreactive proteins were visualized using the enhanced chemiluminescence system (ECL+; Amersham Biosciences) by autoradiography.

2.5. Cell cycle analysis

Cell cycle distribution was analyzed according to standard procedures based on DNA staining with propidium iodide (1 μg/mL, Sigma–Aldrich) and RNase A (100 μg/mL; Roche) in PBS before analysis by FACS (FACSCalibur (BD Biosciences)). Events were recorded statistically (10,000 events/sample) using the CellQuest software (BD Biosciences). Then, the data were analyzed by using Flow-Jo 8.8.5 software (Treestar, Ashland, OR, USA).

2.6. Total RNA extraction

All reagents used are treated anti-RNase. Total RNAs was extracted from 10^7 cells. The cells were washed in PBS 1X, centrifuged at 350*g* for 7 min and then lysed with TRIzol ® reagent (Invitrogen). Total RNA is separated from DNA by addition of 1-Bromo-3-chloropropane and centrifugation. The RNA present in the aqueous phase are precipitated in the presence of isopropanol. RNA pellets were sedimented by centrifugation at 4 °C for 5 min at 10,000*g* and then dissolved in ultrapure water RNase free and quantified with a spectrophotometer (Nanodrop ® ND-1000).

2.7. Reverse transcription and real time PCR

The SuperScript II™ Reverse Transcriptase (Invitrogen, 200 U/μL) was used to perform reverse transcription of 3 μg of total RNA using Oligo(dT) primers (500 mg/mL). Real-time PCR analysis were performed using the Mesa Green qPCR MasterMix Plus for SYBR1 Assay (Eurogentec, Seraing, Belgium) according to the manufacturer's protocol with specific primers: c-Myc forward 5′-cac-cgagtcgtagtcgaggt-3′, Mcl-1 forward 5′-ccaaggcatgcttcggaaa-3′, GAPDH forward 5′-acagtcagccgcatcttctt-3′. Real-time PCR were performed using a 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystem, Lennik, Belgium). Quantification was performed in triplicate and expression levels were normalized using internal standards gene GAPDH. Relative gene expression levels correspond to fold induction compared with untreated cells.

2.8. Network building

Cytoscape 2.8.2 and 3.0.0 (Smoot, Ono et al. 2011) were used to find transcription factors interacting with kinases inhibited by 13c treatment. First we selected the 48 kinases whose residual activity was less than 50% after treatment. MIMI plugin [25] was used to find their common neighbors (neighbors of at least 2 kinases),

using all databases available. This resulted in a network of 408 nodes that was further filtered on the basis of GO annotations to restrict results to transcription factors.

Interactome of STAT5A, STAT5B, STAT3 and STAT1 was retrieved using Pathway Commons in Cytoscape 2.8.1 [26] and interactions from Cancer Cell Map, HPRD and Biogrid databases. Network was filtered by removing proteins whose residual activity was not measured.

2.9. Statistics

Data are expressed as mean ± standard deviation and were analyzed by Student's *t*-test. This test compares the mean of each treatment with control medium. The difference between the series "control" and the series "treated", is considered significant for values of $p < 0.01$ represented by ** and $0.01 < p < 0.05$ represented by *. The results represent the mean ± standard deviation.

3. Results

3.1. Tri-vanillate derivative 13c has a robust impact on kinase activities in vitro

Lamoral-Teys et al. previously reported the *in vitro* effect of 2 μM tri-vanillate derivative 13c (Fig. 1A) on activities of a panel of kinases (246 wild type proteins and 10 mutants) [3]. To find transcription factors (TF) that could be targeted by this treatment, we selected 48 kinases inhibited by more than 50% and built their interactome. After discarding non-TF from the network, we found that 27 TFs were linked to the kinases highly inhibited by 13c (Fig. 1B). Among them, STAT family of TFs was well represented (STAT1, 3, 5a and 5b) and together accounted for more than 25% of all interactions from kinases (30/113) (Kinase gene symbols and corresponding names are described in Table S1).

3.2. 13c inhibits JAK2/STAT3 pathway in HEL cells

In order to validate the capacity of 13c to inhibit kinase activation *in cellulo*, constitutive P-JAK2 expression was analyzed in acute myeloid leukemia HEL cells. Cells were treated with 1–100 μM 13c for 72 h. Phosphorylation of tyrosine residues Y1007/1008 (P-JAK2) within the catalytic site has been assessed by western blot analysis. Results clearly showed that JAK2 is constitutively phosphorylated at this site in HEL cells. A full inhibition of P-JAK2 occurred with 50 μM 13c whereas total JAK2 expression was not inhibited (Fig. 2A). However, we noticed a significant decrease in total JAK2 expression in cells treated with 100 μM 13c for 72 h. The decrease in P-JAK2 by 50 μM 13c occurred as soon as 6 h of treatment like for P-STAT3. Moreover, besides the inhibitory effect of 50 μM 13c on JAK2 phosphorylation at the Y1007/1008 residues, our results showed also inhibition of Y221 phosphorylation (Fig. 2A).

On the other hand, analysis of the expression of non-receptor tyrosine kinase Src showed this onco-kinase to be constitutively activated in HEL cells. Interestingly, Src phosphorylation status at the residue Y416 was inhibited by 13c at 50 μM in HEL cells (Fig. 2B). Moreover, PI3K/AKT pathway has been described as constitutively active in AML cells. Results of western blot analysis showed that 13c at 50 μM inhibited phosphorylation of the regulatory subunit p85 of PI3K as well as its main substrate AKT in HEL cells (Fig. 2B).

3.3. 13c inhibits constitutive and induced P-STAT3 expression

P-JAK2, P-Src and P-PI3K have been reported to phosphorylate and activate the transcription factor STAT3. Analysis of phospho-STAT3 (P-STAT3) in HEL cells showed a constitutive activation of this transcription factor. In order to evaluate the ability of 13c to

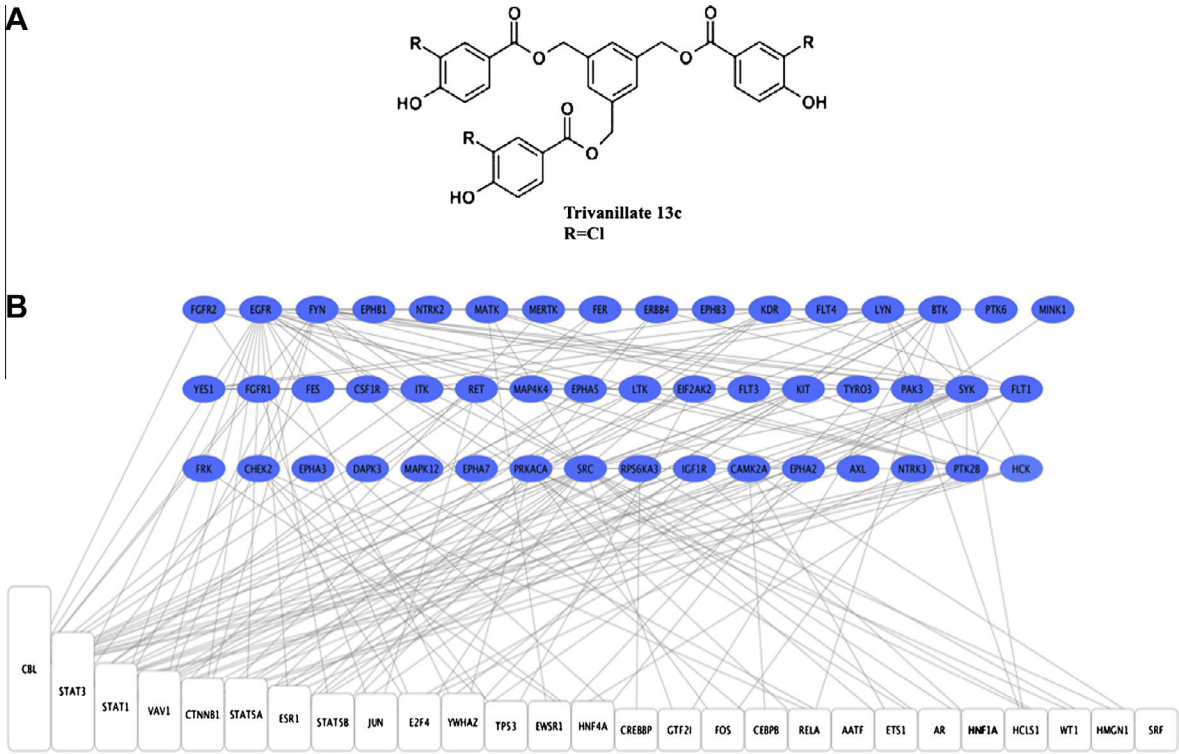


Fig. 1. Chemical structure of 13c and transcription factors linked to kinases inhibited by 13c treatment. (A) 13c is a tri-chloro derivative of trivanillic ester. R = Cl. (B) Network showing transcription factors linked to (at least 2) kinases highly inhibited by 13c treatment (<50% residual activity). Kinases are represented in blue. Transcription factor (white) height is proportional to the number of kinases linked. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

inhibit this phosphorylation in agreement with upstream P-kinase inhibition, we analyzed STAT3 phosphorylation at the Y705 residue by western blot. The inhibitor of P-STAT3 Stattic (Stic) was used at 5 μM as a positive control (Fig. 2C). In cells treated by 13c for 72 h, the expression of total STAT3 was not affected whatever the concentration used while the phosphorylation of Y705 was inhibited by 50 μM 13c. P-STAT3 was similarly inhibited by 5 μM Stattic. A time course treatment of HEL cells with 50 μM 13c during indicated times, showed an inhibition of P-STAT3 as soon as 6 h. STAT3 phosphorylation at Serine 727 residue (S727) was partially inhibited by 13c 50 μM. Indeed, partial inhibition was delayed at 72 h compared to that of Y705. This suggested that phosphorylation of tyrosine residues is more specifically affected by 13c than serine residues, which is in agreement with an effect on tyrosine kinase activity. In order to validate that P-STAT3 expression was inhibited in the nuclear fraction where it will exert its transcriptional activity, P-STAT3 expression was compared in cytoplasmic and nuclear fractions of 13c treated HEL cells. Results showed the absence of P-STAT3 expression in the cytoplasm as well as in the nucleus after treatment. Expression of α-tubulin and lamin B were very low or undetectable in the nucleus and the cytoplasm fractions respectively, validating the results.

To confirm that JAK2/STAT3 signaling pathway is affected by 13c, we studied its effect on cytokine-mediated activation of STAT3 using the lung carcinoma A549 and the CML K562 cell lines. Cells were pre-treated with different concentrations of 13c for 24 h and then stimulated with IFNγ or IL6 for 15 min, which are known to induce JAK2/STAT3 pathway. Western blot analyses showed that cytokines induced P-STAT3 in both cell lines and that 13c was able to prevent this induction in the same range of concentration than for constitutive P-STAT3 (Fig. 2E). As a control we showed that the non-inhibitory concentration of 30 μM 13c did not induce P-STAT3. Therefore, results clearly showed the ability of 13c to inhibit cytokine-mediated activation of STAT3 and confirmed its inhibitory effect of 13c on JAK/STAT3 pathway.

3.4. 13c inhibits Bcr–Abl expression in CML cells

In order to assess whether 13c has a pan inhibitory activity on constitutive tyrosine kinases, we further studied its effect on the fusion oncoprotein Bcr–Abl in two CML cell lines, K562 and MEG-01. Total expression of Bcr–Abl as well as phosphorylation status of the protein was analyzed. Cells were treated for 24 h with 1, 10 and 50 μM 13c and results showed a downregulation of Bcr–Abl in both cell lines at 50 μM. A pretreatment with the proteasome inhibitor MG132 showed that the decrease in Bcr–Abl expression was not dependent on proteasomal degradation (Fig. 3A). The analysis of Bcr–Abl phosphorylation at Y245 and Y412 residues in 13c treated MEG-01 cells at 50 μM revealed that phosphorylation decreased concomitantly with total protein expression, which occurred at 24 h (Fig. 3B). This strongly suggested that phosphorylation status is not affected prior to the down-regulation of Bcr–Abl.

To correlate 13c-mediated decrease of Bcr–Abl expression with downstream signaling we analyzed the expression of P-ERK and P-STAT5. Expression of P-ERK was clearly decreased in MEG-01 cells

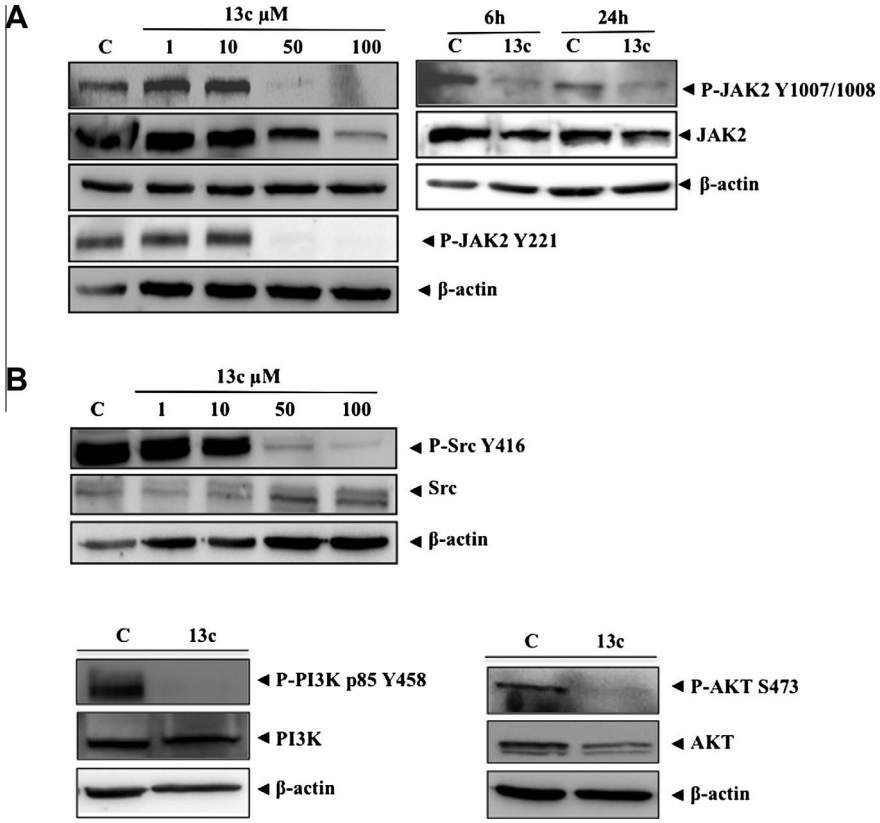


Fig. 2. 13c inhibits kinases and STAT phosphorylation. HEL cells were treated with increasing concentrations of 13c for 72 h or with 50 μM 13c at the indicated times. (A) Western blot analyses of P-JAK2 and JAK2 proteins were performed on the whole cell extracts using indicated antibodies. (B) Western blot analyses of P-Src, Src, P-PI3K, PI3K, P-AKT and AKT proteins were performed on the whole cell extracts using indicated antibodies. (C) Western blot analyses of P-STAT3 Y705 and S727 as well as total STAT3 were performed on whole cell extracts. (D) Western blot analyses of P-STAT3 and STAT3 proteins were performed on cytoplasmic and nuclear extracts from HEL cells treated with 50 μM 13c for 72 h. Lamin B and α-tubulin were used to verify the absence of contamination between nuclear and cytoplasmic extracts. (E) K562 and A549 cells were pre-treated with increasing concentrations of 13c for 24 h and then stimulated by IFNγ or IL6, respectively for 15 min to activate P-STAT3. Western blot analyses of P-STAT3 Y705 as well as total STAT3 were performed on whole cell extracts. In all experiments the level of β-actin protein was used as loading controls. Results are representative of three independent experiments.

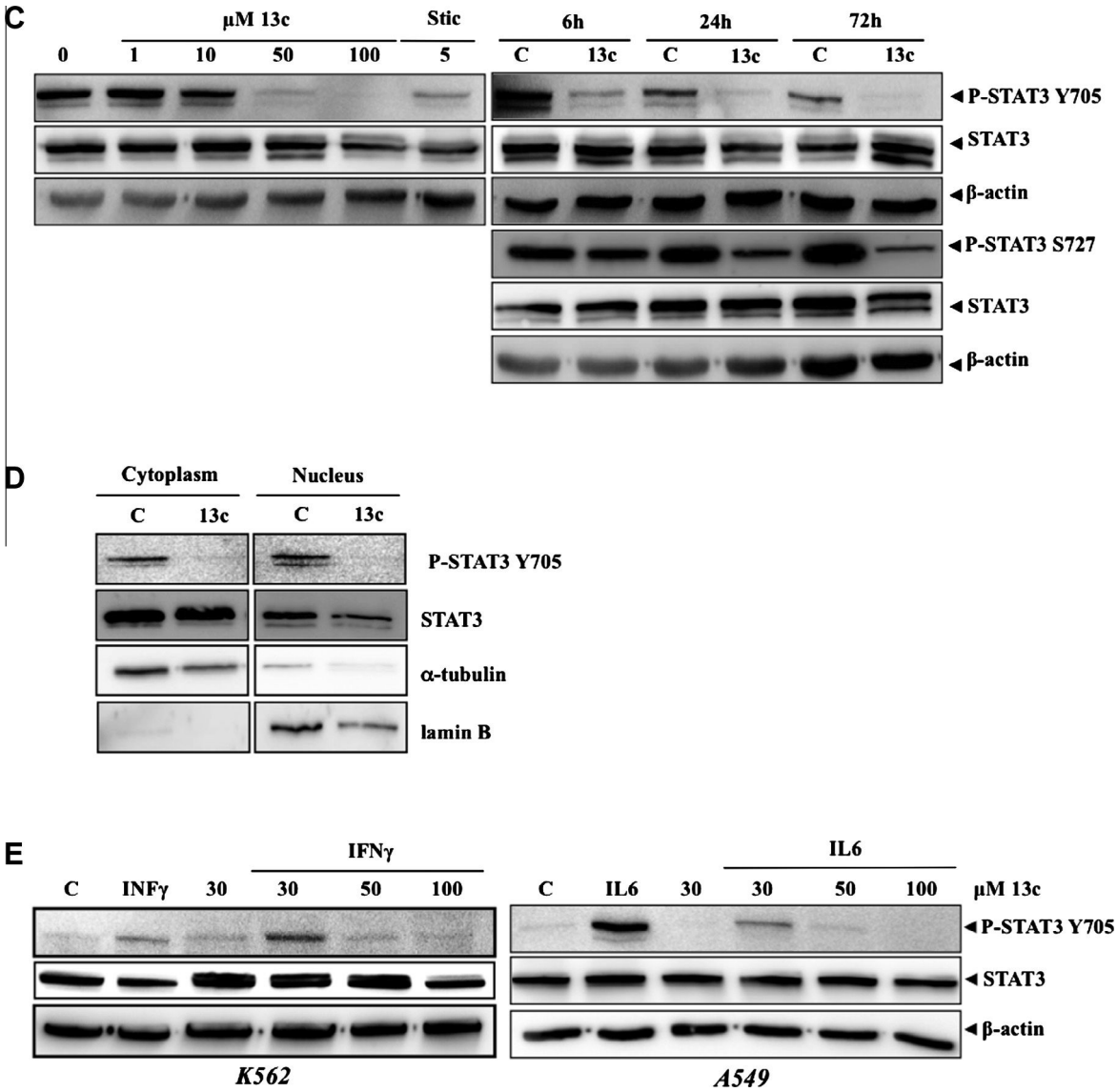


Fig. 2 (*continued*)

after 24 h of 13c treatment in correlation with the decrease in Bcr–Abl expression and its phosphorylated form. Similarly, constitutive expression of P-STAT5 was abolished in MEG-01 and K562 cells after 72 h of 50 μM 13c, while total STAT5 expression was not affected (Fig. 3C).

3.5. 13c inhibits protein phosphorylation in a phosphatase independent manner

According to the observation that 13c had an inhibitory effect on protein phosphorylation including STAT transcription factors and tyrosine kinases, the implication of phosphatases was assessed. HEL cells were treated with different concentrations of ortho-vanadate (OV), a tyrosine-phosphatase inhibitor, prior to 13c addition for 48 h. Results from western blot analysis of P-STAT3 and P-PI3K expressions revealed that OV did not prevent inhibitory activity of 13c whatever the concentration used in HEL cells (Fig. 4). This suggested that 13c-mediated inhibition of STAT and kinases in HEL cells was independent of phosphatase activation. Accordingly, the analysis of phosphatase expression in 13c-treated cells showed that PTEN, SHP1 and PP2A were partially down-regulated after 72 h of 13c treatment (Fig. 4). Results are in favor of an inhibition of tyrosine kinase activity by 13c as previously observed *in vitro* rather that an activation of phosphatases.

3.6. 13c inhibits cell proliferation

Since 13c induced inhibition of constitutive onco-kinases as well as P-STAT transcription factors, we assessed its effect on apoptosis and cell proliferation. We then studied the effect of 13c at 50 μM on proliferation of HEL cells by Trypan blue staining as well as on the cell cycle by using the annexin V/PI assay. Results showed that cell growth was strongly inhibited as early as 48 h and reached a 3-fold decrease at 72 h of 13c treatment compared to control cells (Fig. 5A). Furthermore, 50 μM 13c affected cell cycle particularly at 72 h of treatment (Fig. 5B). While 60% of the cells were in G0/G1 phase at 48 h of 13c treatment, only 26% of the cells were in G0/G1 phase at 72 h versus 60% in the control cells. Interestingly, the rate of cells in sub-G0 phase drastically increased from 25% in control cells to 60% in 13c-treated cells at 72 h, suggesting induction of apoptosis (Fig. 5B).

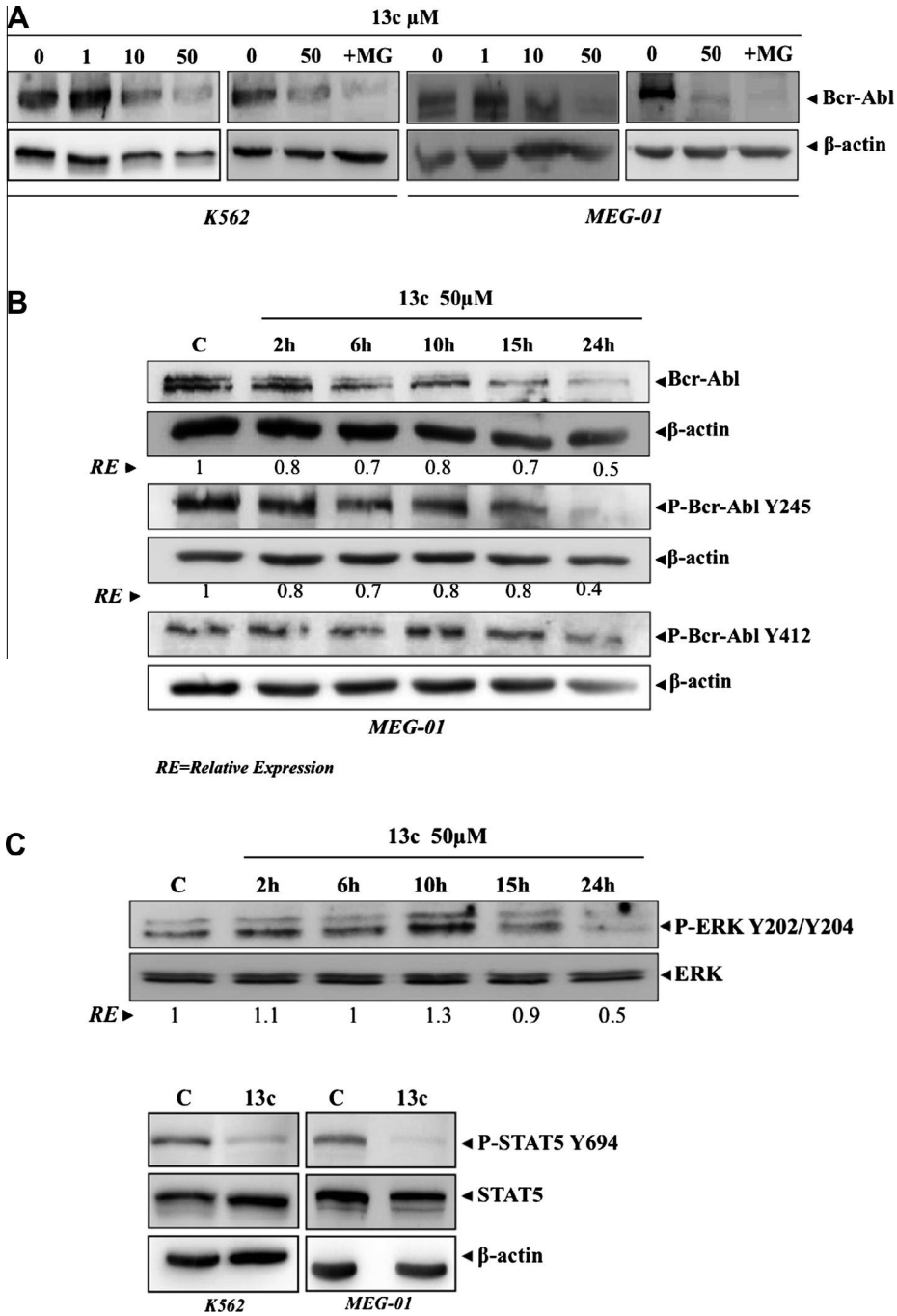


Fig. 3. 13c inhibits Bcr–Abl, P-ERK and P-STAT5 expression. (A) K562 and MEG-01 cells were treated with or without increasing concentrations of 13c for 24 h and with 50 μM 13c for 24 h in the presence or absence of 5 μM MG132. Western blot analysis of Bcr–Abl protein was performed on whole cell extracts. (B) MEG-01 cells were treated with or without 50 μM 13c for indicated times. Western blot analysis of Bcr–Abl and P-Bcr–Abl were performed on whole cell extracts using indicated antibodies. (C) MEG-01 cells were treated with or without 50 μM 13c for indicated times. Western blot analysis of ERK and P-ERK were performed on whole cell extracts. Western blot analyses of P-STAT5 were performed on K562 and MEG-01 whole cell extracts treated with 50 μM 13c for 24 h. In all experiments the level of β-actin was used as loading controls. Results are representative of three independent experiments.

To study the effect of 13c on apoptosis, HEL cells were treated with 1, 10 and 50 μM 13c for 24 h and 72 h, and Hoechst/PI staining was performed. Observation and numeration of dead cells by fluorescent microscopy revealed that the rate of apoptotic cells increased in a concentration- and time-dependent manner. However, the percentage of apoptotic cells increased only from 19% with 1 μM to 24% with 10 μM 13c after 72 h *vs* 15% in the control cells, while 50 μM 13c induced up to 60% apoptotic cells (Fig. 5C). There results were in agreement with the inhibition of P-STAT3 at 50 μM 13c in these cells (Fig. 2C). 543216Treatment with 5 μM Stattic induced a significant increase in the rate of apoptotic HEL cells reaching 30% (Fig. 5C) and 10 μM even led to 100% cell death (data not shown) at 72 h. Furthermore, apoptosis was also studied in A549, MEG-01 and K562 cells treated with 50 μM 13c for 72 h. The percentage of apoptotic cells was increased up to 80% in K562 cells and 21% in MEG-01 cells, while 13c did not induce A549 cell death. Neither 13c at 100 μM nor Stattic induced apoptosis in A549 cells for 72 h (data not shown), which do not express constitutive P-STAT3 [3]. We further investigated the effect of 13c on viability of healthy cells. PBMCs were treated with

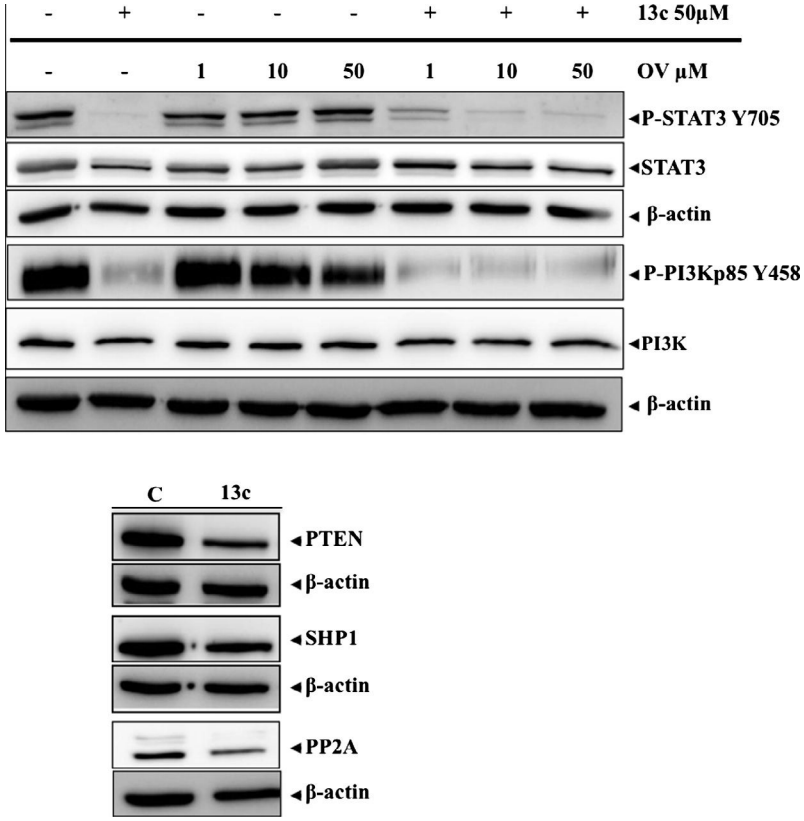


Fig. 4. 13c-mediated inhibition of protein phosphorylation is independent on phosphatases. HEL cells were pre-treated for 1 h with or without increasing concentrations of the tyrosine phosphatase inhibitor, ortho-vanadate (OV) and with or without increasing concentrations of 13c for 48 h. Western blot analysis of P-STAT3, STAT3, P-PI3K, PI3K, were performed using indicated antibodies. Expression of phosphatases PTEN, SHP1 and PP2A was studied by western blot on HEL whole cell lysates after 72 h of 50 μM 13c treatment. In all experiments the level of β-actin protein was used as loading controls. Results are representative of three independent experiments.

50 μM 13c for 24, 48 and 72 h and results showed 5%, 7% and 6% of cell death respectively (Fig. 5C), witnessing excellent differential toxicity.

3.7. 13c inhibits c-Myc and Mcl-1 expression

To correlate P-STAT inhibition with the effect of 13c on apoptosis and proliferation, c-Myc and Mcl-1 mRNA expression were analyzed by real-time PCR in HEL cells at 24 h and MEG-01 cells at 24 h and 72 h. Results showed that STAT target gene expression was down regulated in both cell lines treated with 50 μM 13c (Fig. 5D). Decrease in c-Myc mRNA expression occurred as soon as 24 h of 13c treatment in HEL cells while it occurred at 72 h in MEG-01 cells. Moreover, the analysis of the onco-protein c-Myc and the anti-apoptotic protein Mcl-1 by western blot showed a decrease in their expression as early as 24 h of 13c treatment (Fig. 5D), with a proteasome-dependent degradation for c-Myc (Fig. S1). However, c-Myc and Mcl-1 expression did not decrease in 5 μM Stattic-treated HEL cells at 24 and 72 h, whereas P-STAT3 was inhibited at this concentration in HEL cells (Fig. 2C). Analyses of NF-κB expression in cytoplasmic and nuclear extracts of HEL and MEG-01 cells showed that NF-κBp50/p65 was not constitutively activated in these cells. The absence of NF-κB activity in MEG-01 cells was confirmed by Luciferase assays in control cells vs TNFalpha induced cells (Fig. S2). These results suggest that NF-κB is not involved in the constitutive expression of c-Myc and Mcl-1 genes. Furthermore, results showed that Bcl-2 expression, which was shown to involve S727 phosphorylation of STAT3, was slightly decreased after 72 h of 13c treatment in HEL cells (Fig. 5D).

3.8. 13c induces the intrinsic apoptosis pathway

Pro-apoptotic effect of 13c has been confirmed by studying the activation of pro-caspases and poly ADP ribose polymerase (PARP) in HEL and MEG-01 cells. Cells were treated by 50 μM 13c or 5 μM Stattic for 24 h and 72 h and the activation of pro-caspases 8, 7, 9 and 3 has been analyzed by western blot. Total protein extracts from etoposide-treated U937 cells were used as a positive control for the cleavage of the caspases. Results showed that 13c as well as Stattic had no effect on caspase 8 cleavage while caspases 7, 9 and 3 as well as PARP were cleaved in both cell lines (Fig. 5E). Results indicated that 13c induces intrinsic pathway of apoptotic cell death in these cell lines, in correlation with onco-kinase inhibition and most likely through inhibition of P-STAT3 and P-STAT5.

4. Discussion

Tri-vanillate 13c was shown to exhibit inhibitory activity on cancer cell proliferation through a cytostatic effect [23] while *in vitro* kinase assays revealed that 13c decreased the residual activity of 48 among 256 by more than 50% [3]. Many cancers result from the activation of kinases including Janus Kinase (JAK), sarcoma viral oncogene homolog (Src), fibroblast growth factor receptors (FGFR), mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK8/JNK1), epidermal growth factor receptor (EGFR) or Abelson (Abl) which were all inhibited by 13c in the *in vitro* study. Furthermore, anti-inflammatory and anti-proliferative properties of the divanillate-based polyphenol curcumin (diferuloylmethane) are mediated through the modulation of multiple cell-signaling molecules and transcription factors, including NF-κB, STAT3 and STAT5 [27,28]. According to these data, we hypothesized that 13c is able to affect

constitutively activated signaling pathways leading to cancer promotion. By establishing a network linking kinases with less than 50% residual activity to transcription factors (TF), we found that the STAT family of transcription factors (STAT1, 3, 5a and 5b) displayed the largest number of connections with kinases. This suggested that STAT TFs were potentially impacted by 13c treatment through related kinases.

Constitutive activation of STAT family of TFs has been linked to tumor development and is now widely recognized as a cancer-promoting factor. A couple of oncogenes including kinases, such as Src,

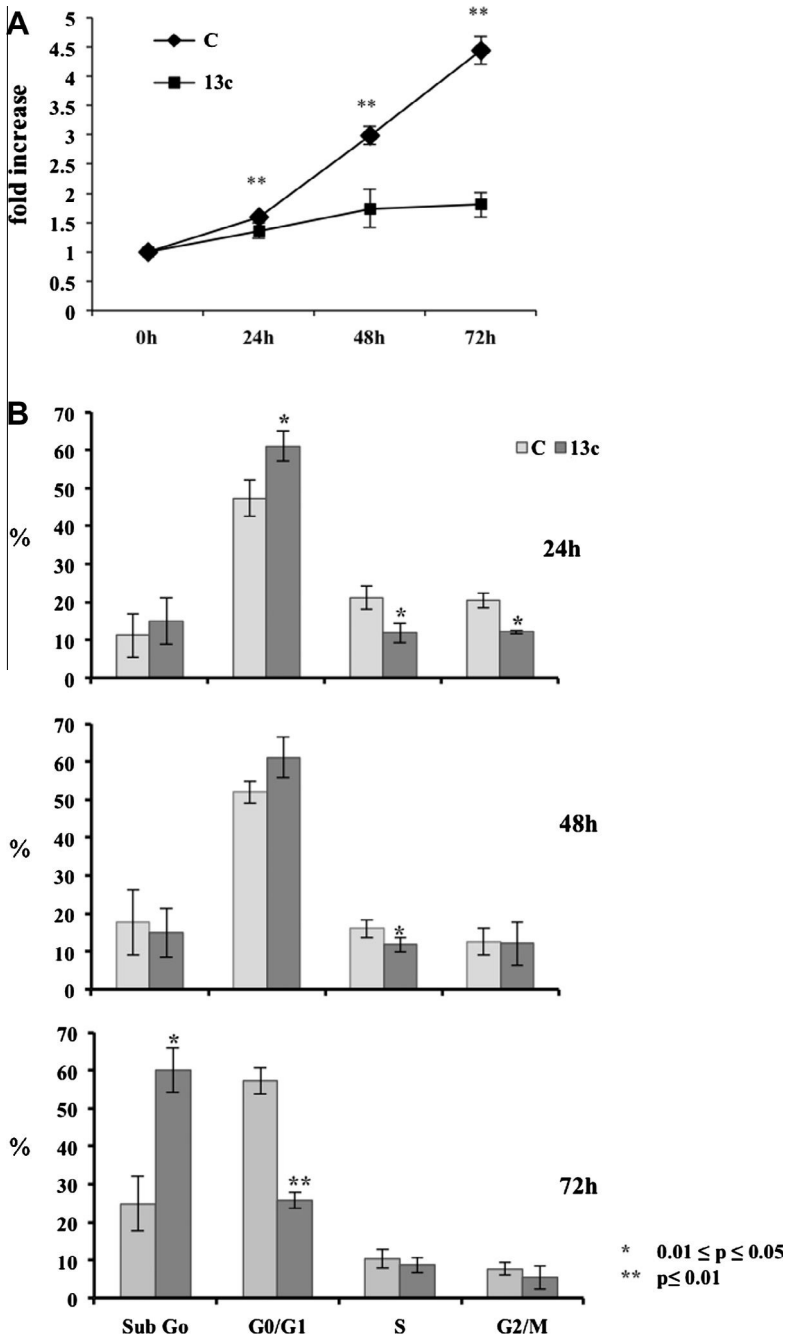


Fig. 5. 13c prevents cell proliferation and induces apoptosis. HEL cells were treated with or without 50 μM 13c for indicated times. (A) HEL cell death was evaluated by Trypan blue staining and numeration at 24, 48 and 72 h. (B) Cell cycle analysis was performed by propidium iodide staining and cytometry. (C) Cells were treated with or without different concentrations of 13c for 24 or 72 h. Graph represents the percentage of apoptotic HEL, A549, MEG-01 and K562 cells according to the time of treatment and 13c concentration. Cytotoxicity of 13c at 50μM on healthy cells was estimated by Trypan blue staining of PBMCs. Results are presented as the average ± standard deviation of at least three independent experiments. (D) MEG-01 and HEL cells were treated with or without 50 μM 13c. Total mRNA was extracted after 24 h or 72 h of MEG-01 and HEL cells treatment and mRNA expression of c-Myc and Mcl-1 genes was analyzed by Real Time PCR. Results are expressed as to the average ± standard deviation of at least three independent experiments. Western Blot analysis of c-Myc and Mcl-1 proteins were performed on MEG-01 and HEL whole cell lysates after 24 and 72 h of treatment. (E) HEL and MEG-01 cells were treated with or without 50 μM of 13c for 24 h and 72 h. Western blot analysis of caspases 3, 7, 8, 9 and PARP proteins were performed on the whole HEL and MEG-01 cells extracts. Treatment of U937 cells with 100 μM etoposide was used as a positive control for pro-caspases (pro-casp) cleavage and PARP. In all experiments the level of β-actin protein was used as loading controls. Results are representative of three independent experiments. $^{*}P$ $0.01 \leqslant P \leqslant 0.05$ and $^{**}P \leqslant 0.01$ versus control group.

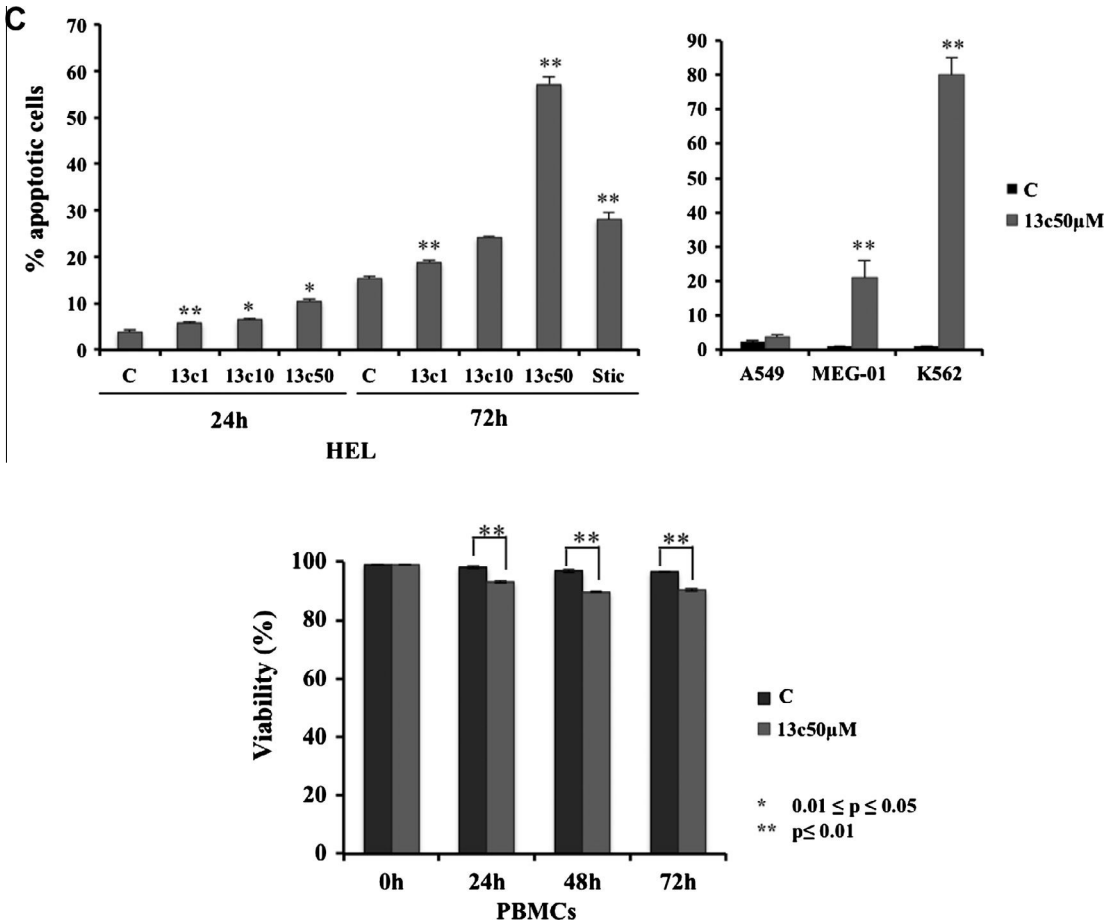


Fig. 5 (*continued*)

JAK, Bcr–Abl and PI3K [4,5] are able to phosphorylate and consequently activate STAT transcription factors.

To study the ability of 13c to inhibit constitutive kinases-mediated cell-signaling pathways, we used cellular models displaying constitutive activity of onco-kinases as well as constitutive expression of P-STAT. The acute myeloid leukemia (AML) HEL cell line exhibits the mutated JAK2V617F and constitutive P-STAT3, while the chronic myeloid leukemia CML K562 and MEG-01 cells express the fusion protein kinase Bcr–Abl and constitutive P-STAT5. Experimental results showed that 13c at 50 μM inhibited phosphorylation of tyrosine residues of JAK2, Src, PI3K, AKT and ERK kinases, as well as P-STAT3 and P-STAT5. Our results suggested that 13c inhibits tyrosine kinase activities in agreement with the *in vitro* kinase screen. Since the inhibition of serine phosphorylation of STAT3-S727 was only partial and delayed in HEL cells, the effect of 13c seems to discriminate tyrosine phosphorylation. Indeed, inhibition of P-STAT3-Y705 and P-JAK2-Y1007/1008 occurred as soon as 6 h and was total after 72 h of 13c 50 μM treatment as for tyrosine residues in P-Src, P-PI3K and P-ERK. Nevertheless, P-AKT-S473 was inhibited after 72 h of 13c treatment. Concerning the potential mechanism of action of 13c, the inhibition of phosphatases by orthovanadate (OV) showed that 13c-mediated inhibition of P-STAT3 was independent of phosphatases activation. Moreover, the analysis of reactive oxygen species (ROS) activation in K562 and HEL cells showed that 13c was not able to induce ROS in these cells after 2, 4 and 6 h of 13c treatment (Fig. S3) [29], when P-STAT3 is inhibited. These data were in agreement with an inhibitory effect of 13c on P-STAT3 through the inhibition of upstream kinases.

However, the inhibitory activity of 13c on tyrosine phosphorylation is not a general effect since phosphorylation of two tyrosine residues within the oncoprotein Brc-Abl were not inhibited. Interestingly, some kinase catalytic activities were not negatively affected in the *in vitro* kinase assays, including AKT activity whereas its phosphorylation was inhibited in HEL cells. In this specific case, inhibition of P-AKT-S473 is likely a secondary effect resulting from primary inactivation of upstream kinases including the serine/threonine PI3K since phosphorylation/activation of p85 regulatory subunit was inhibited by 13c. Besides, it was also reported that Notch signaling induces activation of STAT3 in the self-renewal phase of $CD34^+$ hematopoietic cells through the JAK1/PI3K/AKT pathway [12], suggesting a role for PI3K/AKT in STAT3 activation. Similarly P-STAT3-Y705 inhibition should result from upstream inhibition of kinases JAK2 and Src, since P-JAK2 and P-STAT3 were inhibited at the same concentration (50 μM 13c) as soon as 6 h in HEL cells. Indeed, constitutive STAT activation generally results from the permanent activation of oncogenic tyrosine kinases [4,5]. JAK2V617F mutation triggers constitutive expression of P-STAT3-Y705 and resistance to pro-apoptotic stimuli [30]. Y1007/1008 residues are located in the catalytic pocket of JAK2 and the Y221 residue is involved in the enzymatic activity of the protein [31]. As phosphorylation is critical for JAK2 activity, 13c-mediated inhibition of these Y-residues consequently leads to inactivation of substrates including STAT. Inhibition of JAK2 could not be substituted by P-Src which was also inhibited by 13c. Moreover, the down-regulation of Bcr–Abl in MEG-01 and K562 cells was correlated to inhibition of constitutive P-STAT5 as well as P-ERK in these cells. Bcr–Abl activates the extra cellular sig-

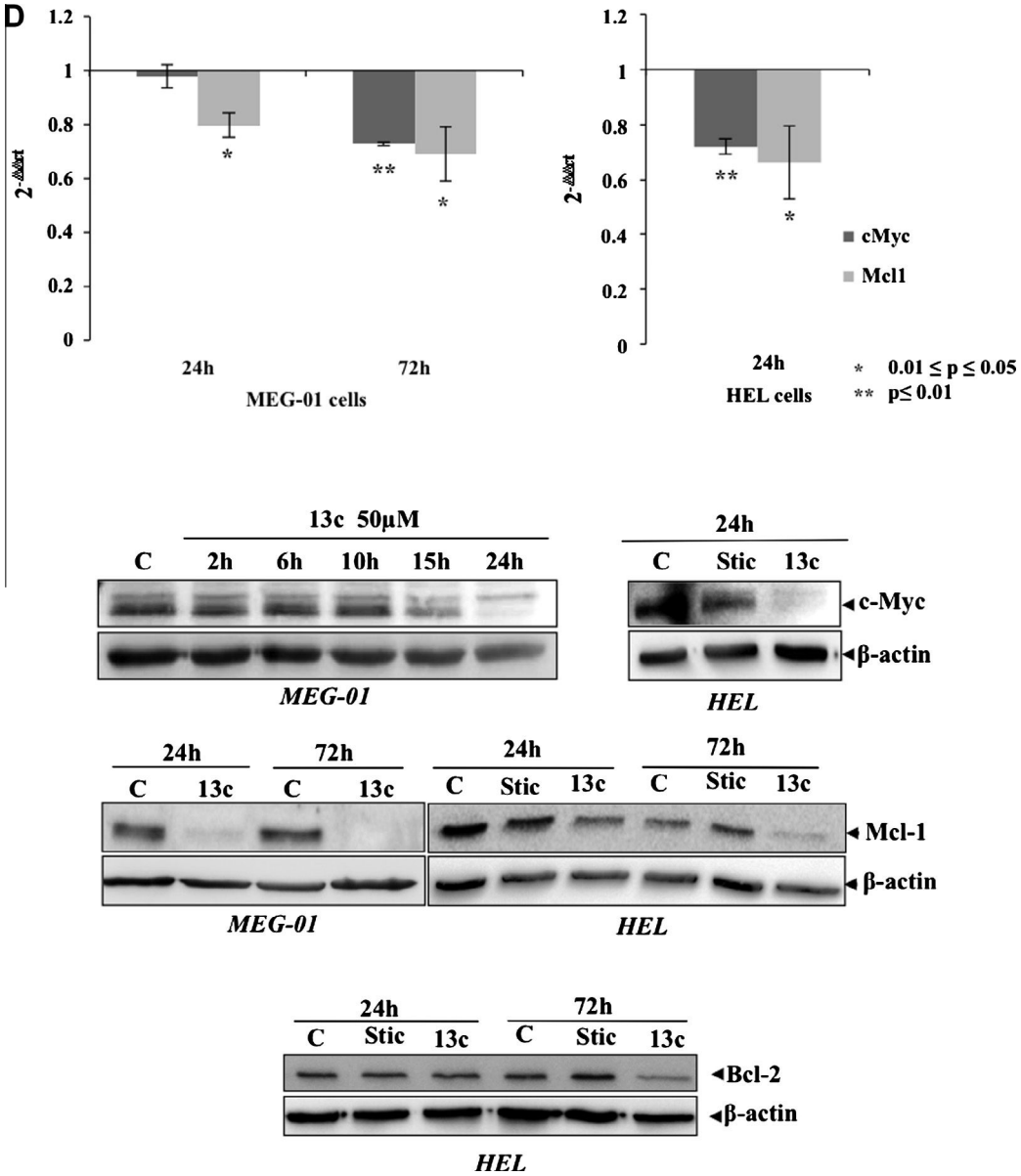


Fig. 5 (*continued*)

nal-regulated kinase (ERK)1/2 translocation to the nucleus through the Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway leading to the phosphorylation of many proteins involved in cell proliferation such as STAT factors and c-myc. Quantification of immuno-blots showed that Bcr–Abl expression was decreased after 24 h of 13c 50 µM treatment in K562 and MEG-01 cells. Conversely, apparent inhibition of Y245 and Y412 phosphorylation was concomitant with Bcr–Abl down-regulation. This suggested that 13c does not affect catalytic activity of the tyrosine kinase since Y245 and Y412 residues are involved in Abl kinase activity [32,33]. These results show that 13c is not able to inhibit Y-residue phosphorylation in all proteins. However, it is able to down-regulate the onco-kinase Bcr–Abl, since proteasomal degradation is not involved and the expression of the chaperone protein HSP90 was not affected (data not shown) [34]. Bcr–Abl inhibitor Imatinib blocks kinase activity through competition with ATP [35] while HSP90 inhibitors such as geldanamycin or radicicol lead to Bcr–Abl degradation [36,37]. The mechanism by which 13c inhibits Bcr–Abl expression has not been described yet but seems different from these inhibitors. Regarding results related to proteasomal degradation, Y-residues phosphorylation in Bcr–Abl protein as well as HSP90 expression, it is likely that 13c down-regulates Bcr–Abl at the transcriptional level.

Permanent activation of STAT leads to oncogenesis through the upregulation of target genes such as cyclin D1/D2, c-Myc, Bcl-xL and Mcl-1 among others contributing to the activation of cell cycle and inhibition of apoptosis [5,6]. Inhibition of STAT phosphorylation by 13c led to the absence of P-STAT in the nucleus as shown for STAT3 in HEL cells, suggesting that 13c affects STAT transcriptional activities. This was assessed by real-time PCR analyses of c-Myc and Mcl-1 gene expression.

Nevertheless, c-Myc protein expression was decreased in MEG-01 cells after 24 h of treatment while mRNA expression was not inhibited at this time. Results showed that 13c induced a decrease in c-Myc expression due to proteasome-dependent degradation (Fig. S1). This was in agreement with Bcr–Abl downregulation as c-Myc can be activated directly by ABL SH2 region [38] but also by Bcr–Abl/P-ERK pathway [39]. Moreover, dephosphorylation of c-Myc triggers its destabilization through degradation by the proteasome [40]. Bcl-2 protein expression was partially inhibited after 72 h in correlation with the low inhibitory effect on P-STAT3 S727.

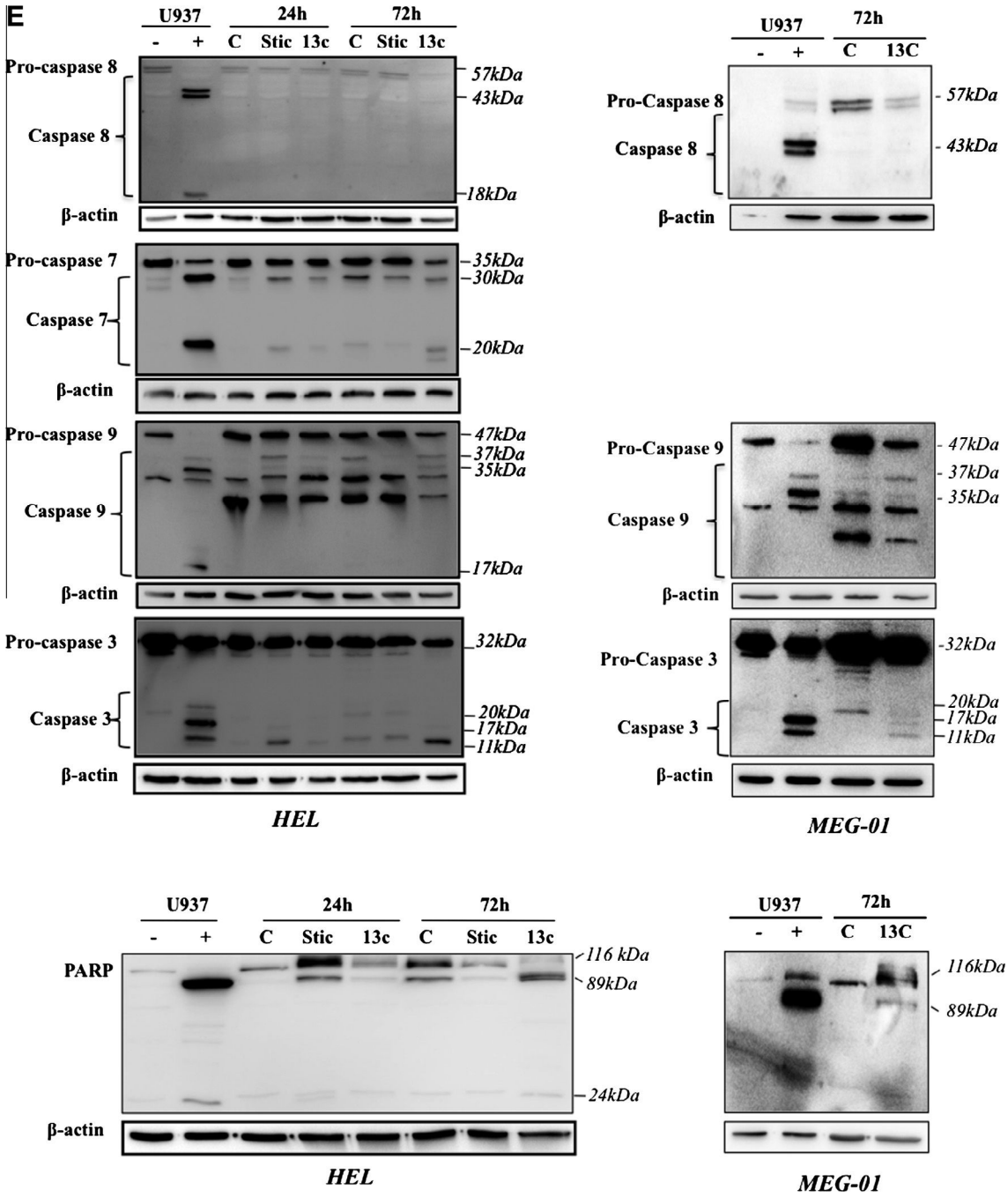


Fig. 5 (*continued*)

Bcl-2 gene has been identified as regulated by STAT3 involving S727 phosphorylation [41].

Inhibition of constitutive P-STAT was in agreement, on one side with down-regulation of these genes and, on the other side, to the pro-apoptotic effect of 13c in cells expressing constitutive STAT3 or STAT5. Interestingly, 13c was not able to induce apoptosis in the lung carcinoma A549 cell line, which does not express constitutive P-STAT3 and STAT5 (data not shown). This suggested that 13c-mediated apoptosis is dependent on P-STAT inhibition and occurs through inhibition of anti-apoptotic stimuli. Nevertheless, the specific inhibitor of P-STAT3 Stattic, did not inhibit Mcl1 nor c-myc expression, suggesting that 13c affects gene expression not only through P-STAT inhibition but potentially through other TF including NF-κB. However, Stattic inhibitory effect on P-STAT3 was less efficient than 13c, which could consequently have a lower effect on STAT3 target genes. Analyses of NF-κB expression in HEL and MEG-01 cells by western blot and Luciferase assays showed that this transcription factor, which also regulates these genes, was not constitutively activated in these cells. This evidenced that 13c cannot exert its inhibitory effect through NF-κB activity.

13c was also able to inhibit IL6- and INFγ-mediated expression of P-STAT3 in A549 and K562 cells respectively. This suggested that 13c could also prevent cytokine-mediated activation of STAT in cancer cells with pathological overexpression of cytokines and/or deregulation of receptors that play critical roles. In this regard, leptin activates JAK2/STAT3 signaling pathway among others in

various cancers [42] and IL6 and TNFalpha signaling pathways lead to TNFR2 overexpression via STAT3 activation in colon cancer cells [43].

Besides the pro-apoptotic activity of this polyphenol, results support the hypothesis that P-STAT3 and P-STAT5 inactivation represents a likely therapeutic target when constitutively active in cancer cells such as in JAK2V617F and Bcr–Abl positive cells. Moreover, inhibiting activated kinases in cancer patients has proved its efficiency since several years with Bcr–Abl inhibitors (Imatinib, Dasatinib), whereas appearance of resistance to these drugs constrain to the development of new molecules exhibiting different mechanisms of action. However, new promising and approved molecules also inhibit Bcr–Abl mainly through ATP competition [44]. JAK inhibitors were also recently approved such as the selective inhibitor of JAK1/2 ruxolitinib (Jakafi) as well as the pan-JAK inhibitor tofacitinib (Xeljanz) among others [45,46]. The polyphenol 13c or derivatives could represent good candidates as kinase inhibitors. In addition, 13c showed a significant *in vivo* anticancer activity in the aggressive B16F10 lung pseudometastatic mouse model [3] indicating a wide spectrum of action for this polyphenol compound. Altogether, results argue in favor of the future use of 13c and tri-vanillate derivatives in anticancer clinical trials.

Conflict of Interest

None.

Acknowledgements

A.T., A.G., S.C. and C.G. are supported by Télévie grants (Fonds National de la Recherche Scientifique, Belgium). Research at the Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) is financially supported by "Recherche Cancer et Sang" foundation, by «Recherches Scientifiques Luxembourg» asbl, by «Een Häerz fir Kriibskrank Kanner» association, the Action Lions "Vaincre le Cancer" Luxembourg, The Fonds National de la Recherche Luxembourg, Télévie Luxembourg and the Foundation for Scientific Cooperation between Germany and Luxemburg for additional support. Further support was received from the European Union (ITN "RedCat" 215009 and Interreg IVa project "Corena"). MD is supported by the National Research Foundation (NRF) by the MEST of Korea for Tumor Microenvironment Global Core Research Center (GCRC) grant, [grant number 2012-0001184]; by the Seoul National University Research grant and by the Research Settlement Fund for the new faculty of SNU. The authors thank Robert Kiss, Alexandra Ionescu and Delphine Lamoral-Theys for their efficient contribution.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.06.023.

References

[1] C. Giovannini, R. Masella, Role of polyphenols in cell death control, Nutr. Neurosci. 15 (2012) 134–149.
[2] T. Esatbeyoglu, P. Huebbe, I.M. Ernst, D. Chin, A.E. Wagner, G. Rimbach, Curcumin – from molecule to biological function, Angew. Chem. 51 (2012) 5308–5332.
[3] D. Lamoral-Theys, N. Wauthoz, P. Heffeter, V. Mathieu, U. Jungwirth, F. Lefranc, J. Neve, J. Dubois, F. Dufrasne, K. Amighi, W. Berger, P. Gailly, R. Kiss, Trivanillic polyphenols with anticancer cytostatic effects through the targeting of multiple kinases and intracellular Ca(2+) release, J. Cell. Mol. Med. (2011).
[4] R.L. Ilaria Jr., R.A. Van Etten, P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members, J. Biol. Chem. 271 (1996) 31704–31710.
[5] Y. Ozawa, A.H. Williams, M.L. Estes, N. Matsushita, F. Boschelli, R. Jove, A.F. List, Src family kinases promote AML cell survival through activation of signal transducers and activators of transcription (STAT), Leuk. Res. 32 (2008) 893–903.
[6] P.K. Epling-Burnette, J.H. Liu, R. Catlett-Falcone, J. Turkson, M. Oshiro, R. Kothapalli, Y. Li, J.M. Wang, H.F. Yang-Yen, J. Karras, R. Jove, T.P. Loughran Jr., Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression, J. Clin. Invest. 107 (2001) 351–362.
[7] A. Trecul, F. Morceau, M. Dicato, M. Diederich, Dietary compounds as potent inhibitors of the signal transducers and activators of transcription (STAT) 3 regulatory network, Genes Nutr. 7 (2012) 111–125.
[8] E.J. Baxter, L.M. Scott, P.J. Campbell, C. East, N. Fourouclas, S. Swanton, G.S. Vassiliou, A.J. Bench, E.M. Boyd, N. Curtin, M.A. Scott, W.N. Erber, A.R. Green, P. Cancer Genome, Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders, Lancet 365 (2005) 1054–1061.
[9] C. James, V. Ugo, N. Casadevall, S.N. Constantinescu, W. Vainchenker, A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects, Trends Mol. Med. 11 (2005) 546–554.
[10] R. Kralovics, R.C. Skoda, Molecular pathogenesis of Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disorders, Blood Rev. 19 (2005) 1–13.
[11] R.L. Levine, M. Loriaux, B.J. Huntly, M.L. Loh, M. Beran, E. Stoffregen, R. Berger, J.J. Clark, S.G. Willis, K.T. Nguyen, N.J. Flores, E. Estey, N. Gattermann, S. Armstrong, A.T. Look, J.D. Griffin, O.A. Bernard, M.C. Heinrich, D.G. Gilliland, B. Druker, M.W. Deininger, The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia, Blood 106 (2005) 3377–3379.
[12] B. Choi, E. Chun, S.Y. Kim, M. Kim, K.Y. Lee, S.J. Kim, Notch-induced hIL-6 production facilitates the maintenance of self-renewal of hCD34+ cord blood cells through the activation of Jak-PI3K-STAT3 pathway, Am. J. Pathol. 180 (2012) 351–364.
[13] F.M. Gu, Q.L. Li, Q. Gao, J.H. Jiang, X.Y. Huang, J.F. Pan, J. Fan, J. Zhou, Sorafenib inhibits growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by blocking STAT3, World J. Gastroenterol. 17 (2011) 3922–3932.
[14] K. Spiekermann, S. Biethahn, S. Wilde, W. Hiddemann, F. Alves, Constitutive activation of STAT transcription factors in acute myelogenous leukemia, Eur. J. Haematol. 67 (2001) 63–71.
[15] J.E. Cortes, M. Talpaz, M. Beran, S.M. O'Brien, M.B. Rios, S. Stass, H.M. Kantarjian, Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia with rearrangement of the breakpoint cluster region. Long-term follow-up results, Cancer 75 (1995) 464–470.
[16] R.M. Arana-Trejo, E. Ruiz Sanchez, G. Ignacio-Ibarra, E. Baez de la Fuente, O. Garces, E. Gomez Morales, M. Castro Granados, R. Ovilla Martinez, M.E. Rubio-Borja, L. Solis Anaya, P. Herrera, J. Delgado Llamas, S. Kofman, BCR/ABL p210, p190 and p230 fusion genes in 250 Mexican patients with chronic myeloid leukaemia (CML), Clin. Lab. Haematol. 24 (2002) 145–150.
[17] O. Hantschel, B. Nagar, S. Guettler, J. Kretzschmar, K. Dorey, J. Kuriyan, G. Superti-Furga, A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl, Cell 112 (2003) 845–857.
[18] M.W. Deininger, J.M. Goldman, J.V. Melo, The molecular biology of chronic myeloid leukemia, Blood 96 (2000) 3343–3356.
[19] N. Chatain, P. Ziegler, D. Fahrenkamp, E. Jost, R. Moriggl, H. Schmitz-Van de Leur, G. Muller-Newen, Src family kinases mediate cytoplasmic retention of activated STAT5 in BCR-ABL-positive cells, Oncogene (2012).
[20] A. Hoelbl, C. Schuster, B. Kovacic, B. Zhu, M. Wickre, M.A. Hoelzl, S. Fajmann, F. Grebien, W. Warsch, G. Stengl, L. Hennighausen, V. Poli, H. Beug, R. Moriggl, V. Sexl, Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia, EMBO Mol. Med. 2 (2010) 98–110.
[21] C. Walz, W. Ahmed, K. Lazarides, M. Betancur, N. Patel, L. Hennighausen, V.M. Zaleskas, R.A. Van Etten, Essential role for Stat5a/b in myeloproliferative neoplasms induced by BCR-ABL1 and JAK2(V617F) in mice, Blood 119 (2012) 3550–3560.
[22] P. Chaturvedi, S. Sharma, E.P. Reddy, Abrogation of interleukin-3 dependence of myeloid cells by the v-src oncogene requires SH2 and SH3 domains which specify activation of STATs, Mol. Cell. Biol. 17 (1997) 3295–3304.
[23] D. Lamoral-Theys, L. Pottier, F. Kerff, F. Dufrasne, F. Proutiere, N. Wauthoz, P. Neven, L. Ingrassia, P.V. Antwerpen, F. Lefranc, M. Gelbcke, B. Pirotte, J.L. Kraus, J. Neve, A. Kornienko, R. Kiss, J. Dubois, Simple di- and trivanillates exhibit cytostatic properties toward cancer cells resistant to pro-apoptotic stimuli, Bioorg. Med. Chem. 18 (2010) 3823–3833.
[24] E. Schreiber, P. Matthias, M.M. Muller, W. Schaffner, Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells, Nucleic Acids Res. 17 (1989) 6419.
[25] J. Gao, A.S. Ade, V.G. Tarcea, T.E. Weymouth, B.R. Mirel, H.V. Jagadish, D.J. States, Integrating and annotating the interactome using the MiMI plugin for cytoscape, Bioinformatics 25 (2009) 137–138.
[26] P. Shannon, A. Markiel, O. Ozier, N.S. Baliga, J.T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, T. Ideker, Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks, Genome Res. 13 (2003) 2498–2504.

[27] R. Blasius, S. Reuter, E. Henry, M. Dicato, M. Diederich, Curcumin regulates signal transducer and activator of transcription (STAT) expression in K562 cells, Biochem. Pharmacol. 72 (2006) 1547–1554.
[28] A. Duvoix, F. Morceau, S. Delhalle, M. Schmitz, M. Schnekenburger, M.M. Galteau, M. Dicato, M. Diederich, Induction of apoptosis by curcumin: mediation by glutathione S-transferase P1–1 inhibition, Biochem. Pharmacol. 66 (2003) 1475–1483.
[29] K. Boengler, E. Ungefug, G. Heusch, R. Schulz, The STAT3 inhibitor Stattic Impairs cardiomyocyte mitochondrial function through increased reactive oxygen species formation, Curr. Pharm. Des. (2013).
[30] W. Zhao, T. Zhang, B. Qu, X. Wu, X. Zhu, F. Meng, Y. Gu, Y. Shu, Y. Shen, Y. Sun, Q. Xu, Sorafenib induces apoptosis in HL60 cells by inhibiting Src kinase-mediated STAT3 phosphorylation, Anticancer Drugs 22 (2011) 79–88.
[31] L.S. Argetsinger, J.L. Kouadio, H. Steen, A. Stensballe, O.N. Jensen, C. Carter-Su, Autophosphorylation of JAK2 on tyrosines 221 and 570 regulates its activity, Mol. Cell. Biol. 24 (2004) 4955–4967.
[32] B.B. Brasher, R.A. Van Etten, C-Abl has high intrinsic tyrosine kinase activity that is stimulated by mutation of the Src homology 3 domain and by autophosphorylation at two distinct regulatory tyrosines, J. Biol. Chem. 275 (2000) 35631–35637.
[33] H. Pluk, K. Dorey, G. Superti-Furga, Autoinhibition of c-Abl, Cell 108 (2002) 247–259.
[34] A. Maloney, P. Workman, HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds, Expert Opin. Biol. Ther. 2 (2002) 3–24.
[35] B. Nagar, O. Hantschel, M.A. Young, K. Scheffzek, D. Veach, W. Bornmann, B. Clarkson, G. Superti-Furga, J. Kuriyan, Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase, Cell 112 (2003) 859–871.
[36] F. Morceau, I. Buck, M. Dicato, M. Diederich, Radicicol-mediated inhibition of Bcr-Abl in K562 cells induced p38-MAPK dependent erythroid differentiation and PU.1 down-regulation, Biofactors 34 (2008) 313–329.
[37] R. Nimmanapalli, E. O'Bryan, K. Bhalla, Geldanamycin and its analogue 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin lowers Bcr-Abl levels and induces apoptosis and differentiation of Bcr-Abl-positive human leukemic blasts, Cancer Res. 61 (2001) 1799–1804.
[38] C.L. Sawyers, W. Callahan, O.N. Witte, Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes, Cell 70 (1992) 901–910.
[39] F. Chang, L.S. Steelman, J.T. Lee, J.G. Shelton, P.M. Navolanic, W.L. Blalock, R.A. Franklin, J.A. McCubrey, Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention, Leukemia 17 (2003) 1263–1293.
[40] M.R. Junttila, P. Puustinen, M. Niemela, R. Ahola, H. Arnold, T. Bottzauw, R. Ala-aho, C. Nielsen, J. Ivaska, Y. Taya, S.L. Lu, S. Lin, E.K. Chan, X.J. Wang, R. Grenman, J. Kast, T. Kallunki, R. Sears, V.M. Kahari, J. Westermarck, CIP2A inhibits PP2A in human malignancies, Cell 130 (2007) 51–62.
[41] H.J. Choi, J.S. Han, Overexpression of phospholipase D enhances Bcl-2 expression by activating STAT3 through independent activation of ERK and p38MAPK in HeLa cells, Biochim. Biophys. Acta 2012 (1823) 1082–1091.
[42] L. Jiang, Z. Li, L. Rui, Leptin stimulates both JAK2-dependent and JAK2-independent signaling pathways, J. Biol. Chem. 283 (2008) 28066–28073.
[43] K.E. Hamilton, J.G. Simmons, S. Ding, L. Van Landeghem, P.K. Lund, Cytokine induction of tumor necrosis factor receptor 2 is mediated by STAT3 in colon cancer cells, Mol. Cancer Res. 9 (2011) 1718–1731.
[44] A.J. Lamontanara, E.B. Gencer, O. Kuzyk, O. Hantschel, Mechanisms of resistance to BCR-ABL and other kinase inhibitors, Biochim. Biophys. Acta (2012).
[45] B.W. Dymock, C.S. See, Inhibitors of JAK2 and JAK3: an update on the patent literature 2010–2012, Expert Opin. Ther. Pat., (2013).
[46] S. Verstovsek, Ruxolitinib: an oral Janus kinase 1 and Janus kinase 2 inhibitor in the management of myelofibrosis, Postgrad. Med. 125 (2013) 128–135.

Genes Nutr (2012) 7:111–125
DOI 10.1007/s12263-012-0281-y

REVIEW

Dietary compounds as potent inhibitors of the signal transducers and activators of transcription (STAT) 3 regulatory network

Anne Trécul · Franck Morceau · Mario Dicato · Marc Diederich

Received: 12 October 2011 / Accepted: 10 January 2012 / Published online: 25 January 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins were described as a family of latent cytosolic transcription factors whose activation is dependent on phosphorylation via growth factor- and cytokine-membrane receptors including interferon and interleukin, or by non-receptor intracellular tyrosine kinases, including Src. A vast majority of natural substances are capable of modulating mitogenic signals, cell survival, apoptosis, cell cycle regulation, angiogenesis as well as processes involved in metastasis development. The inhibition of STAT3 phosphorylation by natural and dietary compounds leads to decreased protein expression of STAT3 targets essentially involved in regulation of the cell cycle and apoptotic cell death. This review details the cell signaling pathways involving STAT transcription factors as well as the corresponding compounds from nature able to interfere with this regulatory system in human cancer.

Keywords Cancer · Inhibitors · STAT3

The family of STAT transcription factors

Structure and function

STAT (signal transducers and activators of transcription) proteins were originally described as a family of cytoplasmic transcription factors. In mammals, seven members of this family, each consisting of 750–900 amino acids, have been identified: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b and STAT6. These transcription factors act as dimers (homo- or hetero-dimers), and their activation is dependent on their phosphorylation or via membrane receptors stimulated by either extracellular factors, including interferon (IFN) and interleukin (IL-6), or by intracellular kinases independent of receptors, including Src. Activation of STATs is usually transient and highly regulated. STAT proteins contain seven conserved structural and functional domains (Fig. 1a) (Schindler and Plumlee 2008).

First, the amino terminal NH_2 domain is involved in the dimerization of STAT proteins and in the stabilization of the interaction established between these dimers and DNA response elements (Braunstein et al. 2003; Mertens et al. 2006). The coiled-coil domain is responsible for controlling the process of import and export of proteins into and from the nucleus (Schindler et al. 2007). The domain that binds DNA, or the DBD (DNA binding domain), is involved in the physical interaction with STAT3-response elements in the promoters of target genes. With the exception of STAT2, all activated STAT homodimers bind directly to a palindromic sequence, the GAS (IFN-gamma-activated site), TTTCCNGGAAA (Becker et al. 1998). The "linker" domain localizes the active dimer to the DNA binding site. The transcriptional activation domain (TAD) contains sites of phosphorylation of serine residues that allow the recruitment of coactivators such as RNA polymerase II, histone acetyltransferase (HAT) (Paulson et al. 2002), histone deacetylase (HDAC) (Rascle et al. 2003) and chromatin modification complexes.

Finally, two sites are particularly critical for the activity of STAT. These are the SH2 domain (Src homology 2, amino acids 575–680), which is linked to the DBD by the linker domain, and a conserved tyrosine close to residue

A. Trécul · F. Morceau · M. Dicato · M. Diederich (✉)
Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Fondation de Recherche Cancer et Sang, Hôpital Kirchberg, 9 Rue Edward Steichen, 2540 Luxembourg, Luxembourg
e-mail: marc.diederich@lbmcc.lu

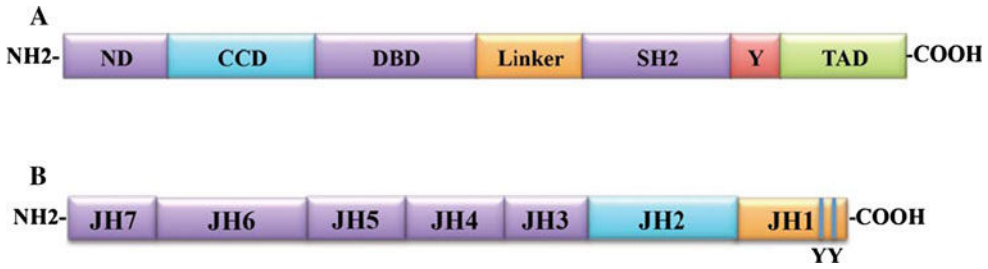


Fig. 1 **a** Schematic representation of the structural domains of STAT proteins, adapted from (Liu et al. 2002). The STAT protein contains an N-terminal domain (*ND*) responsible for stabilizing the binding of STAT dimers to DNA. The "coiled-coil" domain (*CCD*) is involved in interactions with other proteins. The DNA binding domain (*DBD*) allows physical contact with the STAT response elements in the promoter of target genes. The linker domain connects the DBD to the "Src homology 2" domain (*SH2*) and is important in the dimerization of STAT proteins. A tyrosine residue (*Y*) in the TAD domain is phosphorylated and interacts with the SH2 domain of another monomer. The C-terminal TAD area is responsible for the transcriptional activation of target genes. Areas in purple represent the different sites of action of specific inhibitors of STAT3 that have been recently identified. **b** Schematic representation of the structural domains of JAK proteins, adapted from Braunstein et al. (2003). The N-terminal region of the JAK protein contains the JH3–JH7 domains (shown in *purple*) that are involved in protein binding with the receptor. Next, the JH2 domain (shown in *blue*) corresponds to the domain pseudokinase necessary to regulate the catalytic activity of JH1. The JH1 domain is found in the C-terminal and contains the kinase activity. This domain contains two tyrosines that play an important role in protein kinase activity

700. The SH2 domain is highly conserved and allows for the recruitment of specific STAT proteins to the intracellular chains of membrane receptors and participates in the formation of active dimers from STAT monomers. The tyrosine residue close to position 700 in the inactive STAT monomer is phosphorylated by protein kinases of the Janus family kinases (JAK) associated with specific membrane receptors that promote the recruitment of this monomer. Interaction with STAT results from the stimulation of membrane receptors following an extracellular signal that is transduced by cytokines, growth factors and other polypeptide ligands.

The JAK/STAT signaling pathway

The interaction between ligands and specific receptors, which are associated with JAK proteins, triggers receptor dimerization. This dimerization is followed by transphosphorylation, which is required for the activation of JAK proteins. Receptors associated with the JAK/STAT signaling pathway are class I (hematopoietin) and class II (interferon) cytokine receptors. These receptors have a transmembrane domain, and their extracellular region binds the ligand (cytokine), whereas their intracellular domain is used for the interaction with JAK and STAT. The JAK/STAT signaling pathway is highly conserved during evolution. It was first identified in vertebrates, where this signal transduction pathway was found to be activated by cytokines.

JAK proteins belong to a family of intracellular tyrosine kinases with a molecular weight of 120–140 kDa. In mammals, this family of proteins is composed of four members: JAK1, JAK2 and Tyk2, which are widely expressed in a variety of different cell types, and JAK3, which is mainly found in hematopoietic cells. JAK was first identified in 1989 and was termed Just Another Kinase. Later, this protein was renamed Janus Kinase (JAK), after the Roman god, because it has a kinase domain and a "kinase-like" domain that regulates the kinase domain (Pellegrini and Dusanter-Fourt 1997).

These proteins possess various domains, as shown in Fig. 1b. The C-terminus of the protein, JAK homology domain JH1 for domain 1, carries the kinase activity. This domain is structured as a loop involving two tyrosines that play a very important role in regulating kinase activity. For example, for JAK2, tyrosine residues 1007 and 1008 are phosphorylated. A single mutation of tyrosine 1007 suppresses the tyrosine kinase activity of JAK2 (Heinrich et al. 1998). The JH2 kinase-like domain precedes the JH1 domain. This domain may affect kinase activity, but there is no clear explanation found in the literature. Within the N-terminus of the protein, the 5 domains ranging from JH3 to JH7 are involved in the interaction with the receptor. These domains contain conserved sequences found in various JAK proteins (Pellegrini and Dusanter-Fourt 1997).

JAK proteins phosphorylate the cytoplasmic domain of the receptor at tyrosine residues (Fig. 2). These phosphorylated residues are important in recognizing the monomeric and cytoplasmic STATs. STAT proteins are recruited to the phosphorylated tyrosine receptor via their SH2 domain and are then phosphorylated by JAK at tyrosine 705; then, the phosphorylated STAT monomers dimerize. The interaction between the two monomers is established by an interaction between the SH2 domains and phosphorylated tyrosines. The dimer is then imported into the nucleus by importins (Benekli et al. 2009). In the nucleus, active STAT will bind to specific regulatory elements (GAS) within regulatory promoter sequences of target genes. JAK proteins can then

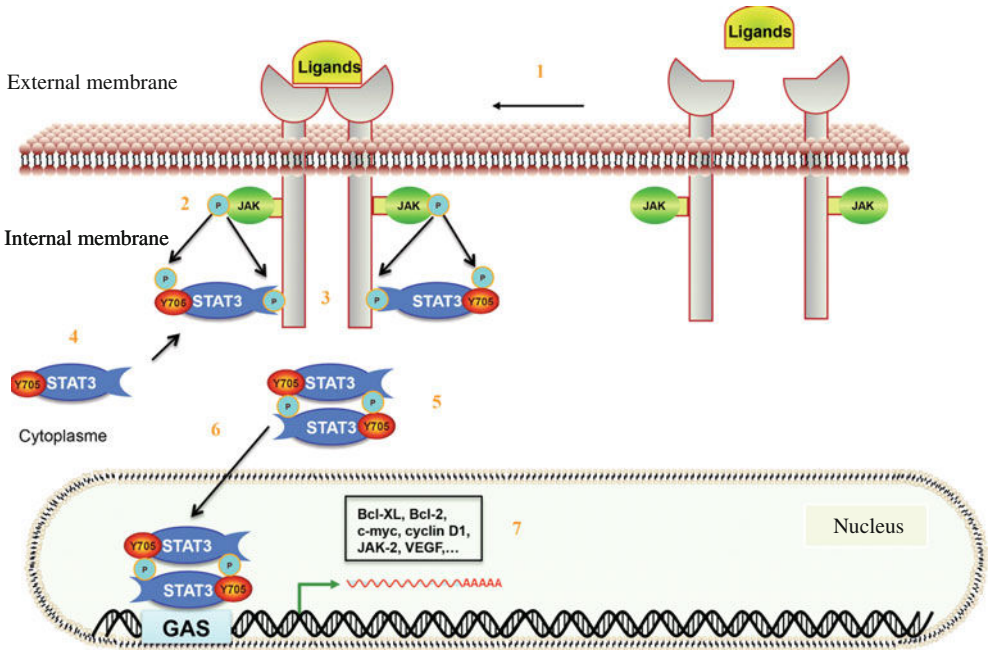


Fig. 2 The JAK/STAT signaling pathway. Ligand binding to the membrane receptor leads to receptor dimerization (*1*) and activation of associated JAK proteins (*2*). JAK phosphorylates the receptor (*3*) to recruit and phosphorylate cytoplasmic STAT factors (*4*). Phosphorylation of STAT factors leading to their dimerization (*5*). As a dimer, STAT will be translocated into the nucleus (*6*) to specifically bind to DNA at the GAS (IFN-gamma-activated site). The STATE dimer activates the transcription of its target genes (*7*). This figure presents STAT3 and its target genes in the nucleus as an example

activate the transcription factor STAT, but it is possible that other proteins may also activate this factor. For example, the protein tyrosine kinase Src may cause dimerization of the transcription factor STAT also resulting in the activation of selected target genes (Darnell 1997).

Involvement of STAT3 in cancer

The STAT family of transcription factors plays an important role in many cellular events, including differentiation, proliferation, inflammation and the immune response. In fact, disruption of the mechanism leading to constitutive activation of STAT is considered to be a cancer-promoting factor (Benekli et al. 2003).

Constitutive activation of STAT is associated with malignant transformation induced by various oncoproteins that are tyrosine kinases, such as Src (sarcoma viral oncogene homolog), Bcr-Abl (breakpoint cluster region-Abelson) or EGFR (epidermal growth factor receptor) (Ilaria and Van Etten 1996; Ozawa et al. 2008). The target genes of STATs, such as cyclins D1/D2, Myc, Bcl-xL and Mcl-1 among others, appear to contribute to oncogenesis by activating cell cycle and inhibiting apoptosis (Epling-Burnette et al. 2001; Ozawa et al. 2008). The constitutive activation of these transcription factors indeed generates a deregulation of growth and cell survival, invasion of tumor cells and thus the formation of metastasis, an increase in angiogenesis and suppression of immune surveillance of the tumor. STAT3 transcription factor is frequently activated in cell lines and leukemic blasts of patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) or acute myeloid leukemia (AML) (Spiekermann et al. 2001). Moreover, STAT3 has also been involved in a wide range of cancer types including multiple myelomas (MM), cutaneous T-cell lymphomas (CTCL), hepatocellular carcinomas (HCC), cholangiocarcinomas (CCA), as well as prostate and pancreatic cancers.

Genetic and biochemical studies have highlighted the key role of STAT3 in signal transduction induced by cytokines, including IL-6, IL-10 and IFN. Knockout mice for STAT3 exhibit early embryonic mortality consistent with its multiple activities, and STAT3 gene extinction in specific tissues has been associated with an inflammatory response, developmental abnormalities and decreased oncogenic potential. Instead, hyperactivation of STAT3 has been associated with immunosuppression and cellular transformation. Compared to healthy cells, where STAT activation is highly regulated, some solid tumor and hematological cancers maintain constitutive activity of STAT3 protein phosphorylation. Accordingly, a clear link between the aberrant activation of STAT3 and tumor formation has been depicted in the literature. Indeed, it was shown that constitutively active STAT3 could cause the inhibition of tumor suppressive activity of p53 by binding

to the p53 promoter (Niu et al. 2005). In addition, recent studies have shown that activation of the STAT3 gene leads to the overexpression of AKT, a key target of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) that is constitutively activated in acute myeloid leukemia (AML). PI3K regulates cell survival and resistance to chemotherapy via pathways that involve mitogen-activated protein kinase (MAPK) as well as transcription factors NF-kB and p53 (Grandage et al. 2005). STAT3 is mainly phosphorylated by JAK2 in combination with a membrane receptor stimulated by a cytokine.

In leukemia, the JAK2 kinase presents a Valine 617 → phenylalanine (V617F) mutation in the JH2 kinase-like domain. This mutation confers either hypersensitivity or independence to hematopoietic cytokines. Moreover, abnormal proliferation and survival of stem cells is affected by this mutation. In 50% of cases of acute myeloid leukemia (AML), STAT3 is constitutively active and this activation leads to many cellular processes, such as cell resistance to apoptosis (Zhao et al. 2011). Moreover, the survival of patients without constitutive phosphorylation of STAT3 has significantly increased. According to Staerk et al. (2007), the V617F mutation suppresses the inhibitory function of the JH2 pseudokinase domain over the kinase domain (JH1). Concerning this mutation, two assumptions were made. The first assumption was that mutant JAK2 could interact normally with the receptor and the complex formed between the receptor and JAK2 V617F entity would be considered to be constitutively active. The second was that the V617F mutation could trigger pathological activation, thereby causing persistent phosphorylation of JAK2 V617F tyrosine at 1007, or at one or more of the 49 known tyrosines within the primary sequence of JAK2. The human erythroleukemia cell line HEL presents the V617F mutation within the JAK2 gene and represents an interesting model to study this mutation and the cellular dysfunctions that it generates. This cell line was established from cells collected in the pleural fluid of a 30-year-old patient suffering from acute myeloid leukemia (AML) (Martin and Papayannopoulou 1982).

Multiple myeloma (MM) is a clonal B-cell neoplasm characterized by an accumulation of neoplastic plasma cells that leads to reduced patient survival (Damber and Aus 2008). As for many types of leukemia, STAT3 is considered to be one of the main factors involved in the pathogenesis and chemoresistance of MM, therefore resulting in a high mortality rate. Indeed, MM cells have been shown to express constitutive activated STAT3 in correlation with the overexpression of the anti-apoptotic proteins Bcl-x_L (Catlett-Falcone et al. 1999; Grad et al. 2000; Tu et al. 1998) and Bcl-2 (Pettersson et al. 1992). On the other hand, recent studies have revealed a key role for chronic inflammation in the different stages of prostate cancer progression (Bhutani et al. 2007). Indeed, prostate cancer proliferation, survival, invasion, metastasis and angiogenesis are linked to the NF-κB, STAT3, AKT and COX-2 signaling pathways (Chan et al. 2010; Shanmugam et al. 2011b). However, NF-κB and STAT3 have been particularly implicated in cell survival, metastasis and angiogenesis of prostate tumors (Gojo et al. 2002). Moreover, STAT3 is often constitutively activated in hepatocellular carcinoma (HCC) (Liu et al. 2002; Niwa et al. 2005) where it induces cell growth and inhibits apoptosis. Interestingly, a clear link between hepatitis C virus (HCV), STAT3 activation and HCC development has been reported (Waris and Siddiqui 2005; Yoshida et al. 2002). As described by many studies, STAT3 represents a good candidate as a target in HCC patients for therapeutic agents including natural compounds (Li et al. 2010; Rajendran et al. 2011a, b; Tan et al. 2010).

Inhibition of STAT

Introduction

To reduce the aberrant activation of STAT proteins, there are several treatment strategies that target these proteins. In particular, it is possible to inhibit specific membrane receptors, tyrosine kinases, mRNAs and proteins that activate STAT. For several years, synthetic compounds inhibited STAT factors by various molecular mechanisms. These inhibitors block the translocation step of the active dimer from the cytoplasm to the nucleus and act at the point where the dimer binds to DNA. Many naturally occurring substances have also appeared in the list of molecules that are potentially active antitumor agents through specific inhibition of STAT.

Constitutive expression of activated STAT factors leads to tumor promotion; therefore, specific inhibition of these mechanisms should preferentially target cancer cells without affecting other cells. Therapeutic strategies considered for the treatment of leukemia and non-hematological cancers (Jing and Tweardy 2005) would specifically target activation of STAT factors, such as the inhibition of transmembrane receptors and associated downstream signaling, or more directly STAT activity. A specific antibody, rituximab, could inhibit the CD20 transmembrane antigen expressed by B cells in non-Hodgkin lymphoma cells, leading to the inhibition of constitutive STAT3 phosphorylation (Alas and Bonavida 2001). These results demonstrate the relevance of a strategy to inhibit STATs via membrane receptors.

The inhibition of tyrosine kinases that are associated with receptors by specific inhibitors has been particularly studied in recent years. The inactivation of JAK2 by the tyrphostin AG490 is an example of the potential

effectiveness of such a treatment to suppress constitutive STAT3 phosphorylation. Indeed, this molecule leads to the arrest of leukemic cell proliferation in vitro and in vivo (Meydan et al. 1996), and apoptosis of U266 myeloma cells (Jing and Tweardy 2005). Another tyrosine kinase inhibitor already in clinical use in the treatment of Bcr-Abl positive leukemia, imatinib, has been shown to have an inhibitory effect on the expression of the anti-apoptotic gene, Bcl-xL, which is a target gene of STAT5 (Horita et al. 2000). In addition, targeting very specific STAT factors can be achieved through the use of competitor peptides to prevent formation of STAT dimers (Turkson et al. 2001). Other strategies that use highly selective inhibitors of STAT mRNA include single-strand oligonucleotides or siRNA (small interfering RNA) (Lee et al. 2004).

Inducing in vitro growth arrest of tumor cells and apoptosis as well as tumor regression in vivo by inhibition of the constitutive activity of STAT3 is then conceivable by pharmacological or genetic approaches. Selected examples of STAT3 inhibitors are listed in Table 1 (Yue and Turkson 2009). Some molecules will directly target the SH2 domain of the protein to prevent dimer formation and thus the formation of active STAT3. For example, a non-peptide small molecule called Stattic selectively inhibits STAT3 by directly binding to the SH2 domain (Schust et al. 2006). The SH2 domain of STAT3 is indeed critical for the activation of STAT3 and its translocation to the nucleus. Therefore, Stattic has a selective inhibitory effect on activation, dimerization and translocation to the nucleus, while also increasing induction of apoptosis.

Other inhibitors, including CPA-1, CPA-7 (Turkson et al. 2004) or IS3 295 (Turkson et al. 2005), act at the level of the DBD domain responsible for binding of STAT3 to DNA. They block the transcriptional activation of STAT3 target genes. Inhibitors that inhibit the transcriptional activity of STAT3 without affecting phosphorylation may also target the N-terminus. In addition, the use of siRNA and antisense RNA induced apoptosis of tumor cells and tumor regression (Lee et al. 2004). Other strategies inhibit steps upstream of the activation of STAT3. For example, it is possible to use inhibitors of tyrosine kinase to prevent phosphorylation of STAT3.

Natural STAT3 inhibitors and cancer

A vast majority of natural substances are capable of modulating mitogenic signals, cell survival, apoptosis, cell cycle regulation, angiogenesis as well as processes involved in metastasis development. In addition, many natural compounds have been studied in order to elucidate their roles in the signaling pathways implicated in cancer. The chemical structures of the natural compounds with inhibitory activity on STAT3 cited in this review (in italics) are presented in the Fig. 3. Studies have shown that the natural compound, *cryptotanshinone* (Shin et al. 2009), is able to inhibit the rapid phosphorylation of tyrosine 705 in STAT3 and thereby blocks the growth of prostate cancer-derived cells. The inhibition of STAT3 phosphorylation leads to decreased protein expression of STAT3 targets, including cyclin D1, which regulates the cell cycle, survivin, which is responsible for the inhibition of caspase activation, or the anti-apoptotic protein Bcl-xL, which belongs to the Bcl2 protein family and is involved in the survival of cancer cells. This natural compound may also bind directly to STAT3 molecules at the SH2 domain-level to block the formation of STAT dimers. Likewise, *capsaicin* (trans-8-methyl-*N*-vanillyl-6-nonenamide), one of principal ingredients of chili from the plant Capsicum (Solanaceae), can suppress carcinogenesis of the skin, colon, lung, tongue and prostate. Bhutani et al. demonstrated the mechanisms of inhibition of STAT3 in multiple myeloma cells. According to these studies, *capsaicin* is able to block both the inducible and the constitutive activation of STAT3; this effect is correlated with downregulation of the expression of the genes involved in cell survival, proliferation and angiogenesis (Bhutani et al. 2007). Furthermore, the inhibition of STAT3 activation can significantly reduce the pool of nuclear STAT3. This work also showed that *capsaicin* is able to suppress the dose-dependent binding activity of STAT3 to DNA and that this compound may also inhibit the constitutive activation of several kinases, such as JAK1, c-Src and ERK.

Multiple myeloma

Many chemotherapeutic drugs have been used for many years to treat MM patients with variable efficiencies; these drugs include melphalan, prednisone, alkylating agents, Vinca alkaloids and more recently, thalidomide and its derivatives as well as the proteasome inhibitor bortezomib. Moreover, patients frequently develop resistance to these treatments (Dimopoulos et al. 2003).

STAT3 is considered to be one of the main factors involved in the pathogenesis and chemoresistance of MM, therefore resulting in a high mortality rate. Besides its effect on STAT proteins in leukemia cells, *curcumin* was also reported to be a reversible inhibitor of constitutive STAT3, but not STAT5 phosphorylation, in human MM cells (Bharti et al. 2003). This was correlated with the inhibition of STAT3 nuclear translocation in MM cells. Despite its structural similarities with the STAT3 inhibitor AG490, *curcumin* was shown to be more efficient as a STAT3 inhibitor in the U266 cell line (Meydan et al. 1996). On the other hand, the triterpene *celastrol*, a natural compound from a Chinese herbal product, has been studied

Table 1 Inhibitors of STAT3 synthesis, their targets, mode of inhibition and cellular effects, adapted from Yue and Turkson 2009)

Inhibitor	Target site	Mode of inhibition of STAT3 function	Cellular effects	References
PY*LKTK	domain SH2	Dimerization	↓ Malignant cell growth and transformation	Turkson et al. (2001)
Y*LPQTV	domain SH2	Dimerization	ND	Ren et al. (2003)
SS610	domain SH2	Dimerization	↓ Malignant cell growth and transformation ↑ Apoptosis	Turkson et al. (2004)
S3I-M2001	domain SH2	Dimerization	↓ Malignant cell growth ↑ Apoptosis, ↓ Migration	Siddiquee et al. (2007)
STA-21	domain SH2	Dimerization	↑ Apoptosis	Song et al. (2005)
S3I-201	domain SH2	Dimerization	↓ Cell growth ↑ Apoptosis	Siddiquee et al. (2007)
Stattic	domain SH2	Phosphorylation	↑ Apoptosis	Schust et al. (2006)
Catechol-containing compounds	domain DBD	DNA-binding	ND	Hao et al. (2008)
IS3 295	domain DBD	DNA-binding	↓ Cell growth ↑ Apoptosis	Turkson et al. (2005)
CPA-1, CPA-7	domain DBD	DNA-binding	↓ Cell growth ↑ Apoptosis	Turkson et al. (2004)
Galiellalactone	domain DBD	DNA-binding	↓ Cell growth ↑ Apoptosis	Weidler et al. (2000)
Peptide aptamers	domain DBD	DNA-binding	↓ Cell growth ↑ Apoptosis	Nagel-Wolfrum et al. (2004)
Decoy ODN	domain DBD	Compete against endogenous DNA cis element	↓ Cell growth ↑ Apoptosis	Leong et al. (2003)
G-quartet ODN	domain SH2	Phosphorylation	↓ Cell growth ↑ Apoptosis	Jing et al. (2006)
Peptides	ND	Transcriptional activity	↓ Cell growth ↑ Apoptosis	Timofeeva et al. (2007)
JSI-124 & derivatives	JAK?	Phosphorylation	↓ Cell growth ↑ Apoptosis, ↓ invasiveness	Blaskovich et al. (2003)
Withacnistin	JAK?	Phosphorylation	↓ Proliferation, ↑ apoptosis	Sun et al. (2005)

↑ increase, ↓ decrease

as an antiproliferative molecule of MM cells. *Celastrol* has various molecular targets, and its ability to modulate the expression of numerous proteins related to a wide range of cellular activities including pro-inflammatory cytokines, adhesion molecules, proteasome activity, topoisomerase II, potassium channels and heat shock response has been reported (Kannaiyan et al. 2011a). Kannaiyan et al. (2011b) reported that proliferation of MM cell lines was inhibited by *celastrol* in correlation with the inhibition of constitutive and induced activation of STAT3. The effect of *celastrol* occurred in cells both sensitive and resistant to bortezomib. Furthermore, it enhanced bortezomib- and thalidomide-mediated apoptosis in MM cells, concomitantly in order to downregulate STAT3 target genes, including cyclin D1, Bcl-2, Bcl-xL, survivin, XIAP and Mcl-1. According to these results, the authors suggested that *celastrol* could potentially be used in the treatment of MM and other hematological malignancies (Fig. 4).

Acetyl-11-ketoh-boswellic acid (*AKBA*), another natural triterpenoid, is isolated from the Indian frankincense *Boswellia serrata* and exhibits anti-inflammatory and anticancer activities. *AKBA* was reported to be an inhibitor of both constitutive and inducible STAT3 activation through the induction of the Src homology region 2 domain–containing phosphatase 1 (SHP-1). This effect correlated with an inhibitory activity on JAK and c-Src. Regarding the effect of this molecule, a downregulation of STAT3 target genes was expected, resulting in the

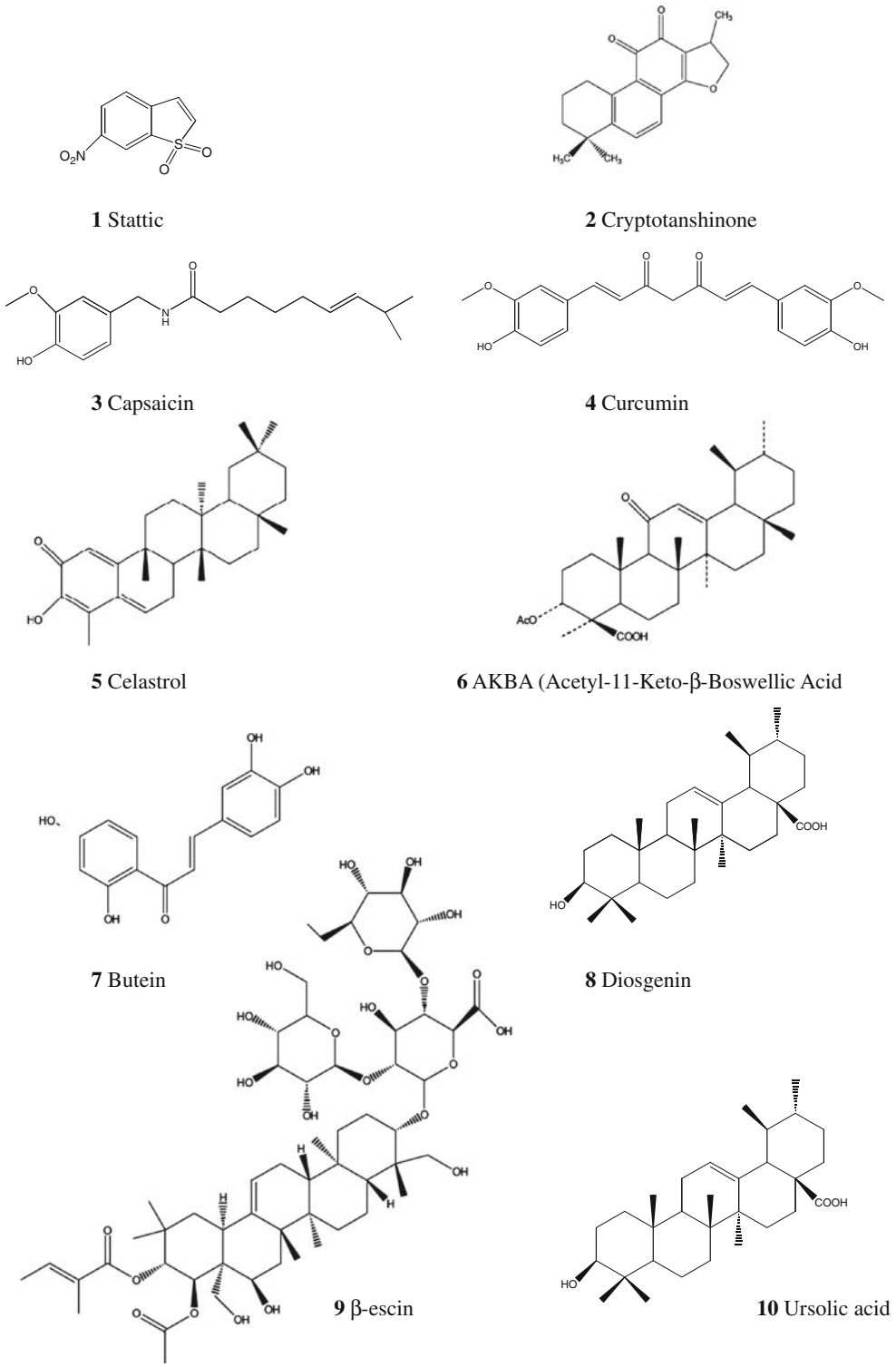


Fig. 3 Chemical structures of different dietary STAT3 inhibitors

suppression of proliferation and induction of apoptosis in MM cells. However, besides its effect on MM cells, *AKBA* was also shown to suppress the growth of glioma, colon cancer, prostate and leukemic cells. These effects on multiple cancer targets can occur through the inhibition of the extracellular signal regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) phosphorylation, NF-κB pathway inhibition via IκB kinase (IKK) as well as topoisomerase I inhibition (Glaser et al. 1999; Hoernlein et al. 1999; Liu et al. 2002; Park et al. 2002; Shao et al. 1998; Syrovets et al. 2005). These

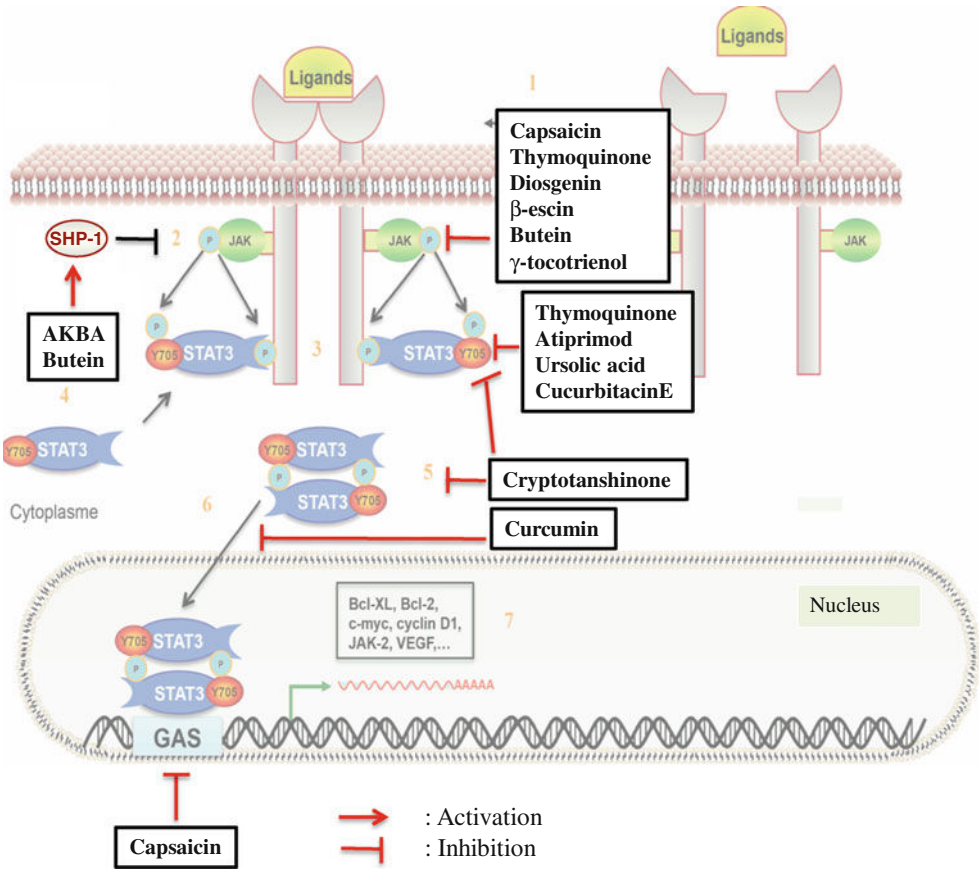


Fig. 4 JAK/STAT signaling pathway targeted by different inhibitors. These inhibitors target the following points in the JAK/STAT signaling pathway: constitutive activation of JAK2, STAT3 phosphorylation, formation of the STAT dimer and binding activity of STAT3 to DNA. In contrast, the phosphatase SHP-1 can be activated

observations suggest that *AKBA* does not specifically affect STAT3 activity but has a wide field of action.

Similarly, the main component isolated from the medicinal plant *Nigella sativa*, *thymoquinone* (*TQ*), was shown to inhibit both constitutive and IL-6-induced STAT3 phosphorylation. Moreover, *TQ* potentiated the apoptotic effects of thalidomide and bortezomib in MM cells. Besides its inhibitory effect on STAT3-target genes, including pro-apoptotic ones, the mechanism of action of this natural compound has been proposed to involve the inhibition of c-Src and JAK2 activation as well as a protein tyrosine phosphatase. Indeed, while *TQ* induced the expression of Src homology-2 phosphatase 2 in correlation with the inhibition of STAT3 phosphorylation, the phosphatase inhibitor vanadate reversed the *TQ*-induced downregulation of STAT3 activation (Li et al. 2010). Similar mechanisms were observed in MM cells with the natural chalcone *butein*, which inhibited STAT3 activation by inducing expression of the tyrosine phosphatase SHP-1. Indeed, the deletion of the SHP-1 gene by small interfering RNA abolished the ability of *butein* to inhibit STAT3 activation (Pandey et al. 2009).

Atiprimod, which is an anti-inflammatory compound that is well tolerated in patients with rheumatoid arthritis, is among the natural products that are able to block MM cell proliferation. *Atiprimod*, a cationic amphiphilic molecule from the azaspirane family of compounds, was shown to induce accumulation of several MM cell lines at the sub-G_0/G_1 phase of the cell cycle (Amit-Vazina et al. 2005). *Atiprimod* inhibited the JAK/STAT pathway, leading to the inhibition of STAT3 phosphorylation. As the constitutive activation of STAT3 in myeloma cells results in the upregulation of anti-apoptotic proteins, the effect of *Atiprimod* on Bcl-2, Bcl-XL and Mcl-1 expression has been assessed in MM cell lines (Catlett-Falcone et al. 1999), and as expected, this compound was found to downregulate the expression of these proteins. Moreover, *Atiprimod* inhibited IL-6 production, which is involved in MM proliferation through STAT3 activation, resulting in the induction of apoptosis in U266-B1 myeloma cells, which express constitutively active NF-κB and STAT3. However, NF-κB expression was also inhibited in *Atiprimod*-treated MM cells, independently of STAT3, suggesting a role for NF-κB in the mechanism of action of *Atiprimod*.

Interestingly, those authors confirmed the effects of *Atiprimod* on myeloma colony culture assays. Fresh BM samples obtained from five patients with newly diagnosed MM were tested, and *Atiprimod* suppressed the growth of myeloma colony-forming cells in a dose-dependent manner (Amit-Vazina et al. 2005).

The chalcone *butein* induced the expression of the tyrosine phosphatase SHP-1, and deletion of the SHP-1 gene by small interfering RNA abolished the ability of *butein* to inhibit STAT3 activation, suggesting a critical role for SHP-1 in the action of this chalcone (Pandey et al. 2009).

Cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)

Furthermore, a study focusing on the antitumor effect of *curcumin* on cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) cell lines and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients has been reported (Zhang et al. 2010). *Curcumin* caused more apoptosis in PBMCs from CTCL patients than from healthy donors. At the same concentrations (5–20 μM), *curcumin* induced apoptosis in a time- and dose-dependent manner in MJ-, Hut78- and HH CTCL-derived cell lines. This study suggested that *curcumin* induced apoptosis in CTCL cells in association with the downregulation of STAT-3 and NF-κB signaling pathways. Indeed, whatever the cell lines or patients' PBMCs, STAT-3 protein and mRNA expression levels decreased after *curcumin* treatment. Moreover, STAT-3 phosphorylation was inhibited and its target genes, bcl-2 and surviving, were downregulated. In addition, *curcumin* activated caspase-3 and induced PARP cleavage.

Hepatocellular carcinoma

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary liver cancer. Currently, the first-line drugs used for HCC include doxorubicin, fluorouracil, cisplatin and mitomycin, but most of these are non-selective cytotoxic molecules with significant side effects. Therefore, it is very important to identify new effective drugs. Among natural compounds from a variety of plants, *diosgenin* (Li et al. 2010), *β-escin* (Tan et al. 2010), *butein* (Rajendran et al. 2011b) and *γ-tocotrienol* (Rajendran et al. 2011a) were reported to inhibit proliferation and to induce apoptosis of HCC cells concomitantly in order to downregulate various STAT3-regulated gene products, including cyclin D1, Bcl-2, Bcl-xL, survivin, Mcl-1 and VEGF. These four natural molecules inhibited constitutive and inducible activation of STAT3 through the inhibition of c-Src, JAK1 and JAK2 activation. The pentacyclic triterpenoid *β-escin* was recently found to exhibit significant antitumor effects in human hepatocellular carcinoma both in vitro and in vivo (Zhou et al. 2009). In addition, this effect of *β-escin* has also been reported to suppress colonic aberrant crypt foci formation in rats and to inhibit growth of colon cancer cells (Patlolla et al. 2006). On the other hand, *diosgenin* and *butein* were shown to inhibit P-STAT3 through the induction of phosphatases. *Diosgenin*, a steroidal saponin isolated from fenugreek, induced the expression of Src homology 2 phosphatase 2 (SH-PTP2) in correlation with the downregulation of constitutive STAT3 activation in HCC cells (Li et al. 2010). As previously described in MM cells, the *butein*-induced inhibition of P-STAT3 involved SHP-1 activation (Pandey et al. 2009), whereas a phosphatase role for this natural chalcone has not been reported in HCC cells. Interestingly, both *diosgenin* and *butein* potentiated the apoptotic effects of paclitaxel and doxorubicin in HCC cells. Moreover, *butein* inhibited the growth of human HCC xenograft tumors in male athymic nu/nu mice when administered intraperitoneally (Rajendran et al. 2011b). These authors suggested that these compounds are interesting as novel blockers of the STAT3 activation pathway with a potential role in the treatment of HCC.

Cholangiocarcinoma

Results recently reported by Prakobwong et al. (2011) suggested that *curcumin* exhibits an anti-cholangiocarcinoma (CCA) potential by suppressing various events involved in multiple steps of carcinogenesis, including its ability to suppress pro-inflammatory pathways. CCA is a major health problem in southeastern Asia because it causes the formation of highly metastatic tumors linked to liver fluke infection and consumption of nitrosamine-contaminated foods.

By using animal models infected with the liver fluke *Opisthorchis viverrini* and submitted to *N*-nitrosodimethylamine administration, the authors investigated the effect of a *curcumin*-supplemented diet on CCA development. Under these conditions, there was a significant reduction in the incidence of CCA and an increase in the survival of animals. These observations were in correlation with the suppression of STAT-3 activation as well as of the transcription factors NF-κB and AP-1. Moreover, a reduction in the expression of the pro-inflammatory proteins COX-2 and iNOS was also observed. As expected, *curcumin* induced caspase activation and poly (ADP-Ribose) polymerase (PARP) cleavage while it suppressed the expression of STAT3 target genes, including proteins related to cell survival (Bcl-2 and Bcl-xL), proliferation (cyclin D1 and c-myc) and angiogenesis (vascular endothelial growth factor, VEGF).

Prostate cancer

Recent studies have revealed a key role for chronic inflammation in the different stages of prostate cancer

progression (Damber and Aus 2008). Indeed, prostate cancer proliferation, survival, invasion, metastasis and angiogenesis have been reported to be linked to the NF-κB, STAT3, AKT and COX-2 signaling pathways (Grivennikov and Karin 2010; Yu et al. 2009). However, NF-κB and STAT3 have been particularly implicated in prostate tumor cell survival, metastasis and angiogenesis (Li and Sethi 2010). A natural compound, the pentacyclic triterpenoid *ursolic acid* (*UA*) (3 β-hydroxy-urs-12-en-28-oic-acid) (Liu 1995), has been reported to be a potent inhibitor of constitutive and inducible STAT3 as well as NF-κB activation in prostate cancer cells (Shanmugam et al. 2011b). The authors also showed that *UA* significantly suppressed the growth of prostate cancer xenografts in vivo while it was previously reported to be able to inhibit tumor promotion, metastasis, angiogenesis and proliferation of a variety of tumor cells, including human multiple myeloma cells (Pathak et al. 2007) melanoma cells (Manu and Kuttan 2008) and breast cancer cells (Kassi et al. 2009).

Predictive analysis using a virtual tumor cell platform that allows for the determining of the primary target of *UA* in the prostate cancer cells showed that *UA* mediates an increase in the apoptotic phenotype by inhibiting STAT3 as well as NF-κB activity. Moreover, by using human androgen-independent DU145 and androgen-dependent LNCaP prostate cancer cell lines, Shanmugam et al. confirmed that *UA* inhibited cell proliferation and induced apoptosis in these prostate cancer cells. These effects were correlated with the inhibition of the canonical NF-κB signaling pathway as well as STAT3 phosphorylation through the upstream inhibition of JAK2 and Src activation. As expected, the effect of *UA* resulted in the downregulation of genes involved in survival and angiogenesis (Shanmugam et al. 2011b). Interestingly, the bioavailability of *UA* or its metabolites in mice serum was evaluated in this study. Results revealed that *UA* did not generate any metabolites in the serum and that the concentration of *UA* was higher than the concentration required to reach in vitro effects. Finally, the circulating concentration was appropriate to trigger inhibition of prostate tumor growth in nude mice. The effects of *UA* were extended to antimetastatic effects through the suppression of CXCR4 expression in prostate cancer both in vitro and in vivo (Shanmugam et al. 2011a).

Pancreatic cancer

Regarding pancreatic cancer, the work of Sun et al. (2010) showed that *cucurbitacin E* of the family of triterpenoids isolated from plants can reduce the phosphorylation of STAT3, leading to inhibition of cell growth, increased expression of p53 and induction of apoptosis of cancer cells. Indeed, p53 can arrest cell cycle progression at different points and induce apoptosis of cells whose growth has become uncontrolled. It is already known that *cucurbitacin E* has antiproliferative activity in the case of breast, lung and prostate cancer. Earlier work by Sun et al. (2005) had highlighted the fact that this compound acts at the level of lung cancer cells through inhibition of cancer cell growth and induction of apoptosis through downregulation of phosphorylated STAT3.

Leukemia

In the case of chronic myeloid leukemia, *cucurbitacin B* from herbaceous plants, belonging to the Cucurbitaceae family, is able to suppress the activation of STAT3. On the basis of the work by Chan et al. (2010), this natural compound can suppress activation of STAT3, resulting in inhibition of cell growth. This phenomenon can be explained by cell cycle arrest or induction of apoptosis. Also in the case of chronic myeloid leukemia, the work of Blasius et al. (2006) showed that *curcumin*, which is the main pigment derived from the roots of *Curcuma longa*, also known as turmeric, may inhibit the transcription factor STAT3. This work led to the fact that *curcumin* is capable of reducing the expression of STAT3 target genes, such as JAK2, v-src, a viral oncogene or cyclin D1, which is involved in regulating the cell cycle. This natural compound plays an important role in the induction of the apoptosis of cancer cells through inhibition of the expression of glutathione *S*-transferase P1-1 (Duvoix et al. 2003), implicated in the detoxification of the cell. *Curcumin* is in fact implicated in the inhibition of many stages of cancer development, including cell proliferation, angiogenesis and metastasis, by modulating expression and activity of different cell signaling mediators (Kunnumakkara et al. 2008). Besides its effect on STAT3 activity in HCC cells, *Sorafenib* also showed efficiency in chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells, which is the most frequent leukemia. CLL is characterized by an accumulation of monoclonal mature B cells in blood, secondary lymphoid tissues and the marrow. Treatments of mononuclear cells from marrow aspirates of CLL patients led to inhibition of B-RAF, C-RAF, ERK and STAT3 phosphorylation in correlation with Mcl-1 downregulation and resulting in caspase-dependent apoptosis (Fecteau et al. 2011). Furthermore, *flavopiridol*, formerly L86-8275 or HMR 1275, is an hemi-synthetic flavonoïd derivative from rohitukine, an alkaloid isolated from the Indian plant *Dysoxylum binectariferum* (Sedlacek et al. 1996). *Flavopiridol* was first described as a cyclin-dependent kinase inhibitor (Carlson et al. 1996). Besides its ability to suppress the growth of different tumor types (Arguello et al. 1998; Bible and Kaufmann 1996; Byrd et al. 1998; Carlson et al. 1996; Gojo et al. 2002; Konig et al. 1997; Patel et al. 1998), this compound was shown to induce cell cycle arrest and apoptosis in acute

myeloid leukemia (AML) in correlation with STAT3 repression (Nelson et al. 2011). *Flavopiridol* is currently in clinical trials for the treatment of different cancers including AML and ALL (Blum et al. 2010).

Conclusion

The transcription factor STAT3 is one of the major proteins controlling the transcriptional regulation of many genes involved in essential and housekeeping cellular functions. Its activity results from the activation of signaling pathways and depends on many factors independent from tissue specificity. Therefore, permanent activation of STAT3 triggers perturbation in many tissues, especially the deregulation of cell death and cell cycle, obviously leading to cancer genesis. Constitutive phosphorylation of STAT3 is then considered to be a potential target for the treatment of many cancers and has to be further explored. In this regard, a couple of natural compounds have revealed a potential or a clear capacity to inhibit STAT3 phosphorylation in in vitro and in vivo investigations, leading to the downregulation of target genes in correlation with the induction of apoptosis and the inhibition of cell proliferation. These effects are generally correlated with the inhibition of the phosphorylation of tyr705. This phosphorylation is known to regulate STAT3 dimerization, leading to its translocation to the nucleus and interaction with DNA. Conversely, the role of ser727 phosphorylation of STAT3 is poorly understood, but it is assumed to be positively and negatively involved in the transcriptional activity of STAT3. Few inhibitors of STAT3 with inhibitory activity on ser727 phosphorylation have been reported. Indeed, original articles describing natural inhibitors of STAT3 usually report the effect on tyr705 phosphorylation, as well as of related tyrosine kinases such as JAK or Src, whereas the effect on ser727 is only marginally described. We can assume that most of the compounds are inactive on ser727 or have likely not been tested so far. Nevertheless, among natural inhibitors, *curcumin* was shown to inhibit phosphorylation of STAT3 at both tyr705 and ser727 residues in biliary cancer cells (Prakobwong et al. 2011). Interestingly, the inhibition of ser727 phosphorylation has been shown to induce apoptosis in Human B-leukemia and other cell lines constitutively expressing phosphorylated STAT3 in ser727 by *curcubitacin-I* (JSI-124) (Ishdorj et al. 2010). Obviously, B-leukemia cells are known to express activated STAT3 with constitutive phosphorylation in ser727 but not in tyr705, supporting the role of ser727 phosphorylation in the oncogenic activity of STAT3 and suggesting this residue as a potential target for natural inhibitors of STAT3 activity.

As observed, the molecular structures of the active compounds as inhibitors of STAT3 phosphorylation differ. Therefore, it may be considered difficult to establish a real relationship between the molecular structures and the inhibitory activity of these natural compounds. However, these compounds act through very similar mechanisms. On the one hand, most of them appear as non-specific inhibitors of STAT3 activity because they do not target functional regions of the protein. On the other hand, they are all described as acting via the inhibition of upstream kinases, such as JAK2 or Src, or as inducers of Src homology 2 phosphatases. One can consider that constitutive activation of STAT3 especially occurs in cancer cells, which would allow for targeting of cancer cells with specific inhibitors of P-STAT3. Nevertheless, the issue concerning the efficiency of very specific inhibitors has to be considered because the action of such molecules would likely be prevented by the continuous stimulation of signaling pathway-mediated STAT3 activation. Indeed, constitutive phosphorylation of STAT3 results from these upstream kinase activities due to mutations or hypersensitivity of cancer cells to stimulatory cytokines. However, inhibiting P-STAT3 at the source of signaling pathways would be challenging because healthy cells would also be affected, unless there is a way to accurately target only tumor cells. Moreover, it must be mentioned that most of the natural compounds described here have been shown to inhibit STAT3 phosphorylation and related signaling pathways in in vitro assays. The effects may be obviously not reproducible in vivo due to the artifacts that occur in cell culture including product half-life or product modifications.

In conclusion, it is unknown what the future holds in terms of alternative therapeutics to inhibit cell proliferation through the inhibition of STAT3 activation. However, the fact that there is an abundance of natural compounds with inhibitory properties against this transcription factor should constitute the molecular basis for the synthesis of more efficient molecules. Some of these compounds have already shown in vivo efficiency against tumors, revealing the necessity of investigating and screening such natural molecules that possess an undeniable promising future in anticancer therapeutics and chemoprevention.

Acknowledgments AT was supported by a grant from the Action Lions "Vaincre le Cancer." Dr. Diederich's research at the Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) is financially supported by the "Recherche Cancer et Sang" foundation, "Recherches Scientifiques Luxembourg," the "Een Häerz fir Kriibskrank Kanner" association, the Action Lions "Vaincre le Cancer" Luxembourg and Televie Luxembourg. Editing and printing costs were covered by the Fonds National de la Recherche (FNR), Luxembourg.

References

Alas S, Bonavida B (2001) Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) activity in B-non-Hodgkin's

lymphoma through inhibition of the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs. Cancer Res 61:5137–5144

Amit-Vazina M, Shishodia S, Harris D, Van Q, Wang M, Weber D, Alexanian R, Talpaz M, Aggarwal BB, Estrov Z (2005) Atiprimod blocks STAT3 phosphorylation and induces apoptosis in multiple myeloma cells. Br J Cancer 93:70–80

Arguello F, Alexander M, Sterry JA, Tudor G, Smith EM, Kalavar NT, Greene JF Jr, Koss W, Morgan CD, Stinson SF, Siford TJ, Alvord WG, Klabansky RL, Sausville EA (1998) Flavopiridol induces apoptosis of normal lymphoid cells, causes immunosuppression, and has potent antitumor activity in vivo against human leukemia and lymphoma xenografts. Blood 91:2482–2490

Becker S, Groner B, Muller CW (1998) Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. Nature 394:145–151

Benekli M, Baer MR, Baumann H, Wetzler M (2003) Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. Blood 101:2940–2954

Benekli M, Baumann H, Wetzler M (2009) Targeting signal transducer and activator of transcription signaling pathway in leukemias. J Clin Oncol 27:4422–4432

Bharti AC, Donato N, Aggarwal BB (2003) Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells. J Immunol 171: 3863–3871

Bhutani M, Pathak AK, Nair AS, Kunnumakkara AB, Guha S, Sethi G, Aggarwal BB (2007) Capsaicin is a novel blocker of constitutive and interleukin-6-inducible STAT3 activation. Clin Cancer Res 13:3024–3032

Bible KC, Kaufmann SH (1996) Flavopiridol: a cytotoxic flavone that induces cell death in noncycling A549 human lung carcinoma cells. Cancer Res 56:4856–4861

Blasius R, Reuter S, Henry E, Dicato M, Diederich M (2006) Curcumin regulates signal transducer and activator of transcription (STAT) expression in K562 cells. Biochem Pharmacol 72: 1547–1554

Blaskovich MA, Sun J, Cantor A, Turkson J, Jove R, Sebti SM (2003) Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. Cancer Res 63:1270–1279

Blum W, Phelps MA, Klisovic RB, Rozewski DM, Ni W, Albanese KA, Rovin B, Kefauver C, Devine SM, Lucas DM, Johnson A, Schaaf LJ, Byrd JC, Marcucci G, Grever MR (2010) Phase I clinical and pharmacokinetic study of a novel schedule of flavopiridol in relapsed or refractory acute leukemias. Haematologica 95:1098–1105

Braunstein J, Brutsaert S, Olson R, Schindler C (2003) STATs dimerize in the absence of phosphorylation. J Biol Chem 278: 34133–34140

Byrd JC, Shinn C, Waselenko JK, Fuchs EJ, Lehman TA, Nguyen PL, Flinn IW, Diehl LF, Sausville E, Grever MR (1998) Flavopiridol induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells via activation of caspase-3 without evidence of bcl-2 modulation or dependence on functional p53. Blood 92:3804–3816

Carlson BA, Dubay MM, Sausville EA, Brizuela L, Worland PJ (1996) Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. Cancer Res 56:2973–2978

Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna JL, Nunez G, Dalton WS, Jove R (1999) Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. Immunity 10:105–115

Chan KT, Li K, Liu SL, Chu KH, Toh M, Xie WD (2010) Cucurbitacin B inhibits STAT3 and the Raf/MEK/ERK pathway in leukemia cell line K562. Cancer Lett 289:46–52

Damber JE, Aus G (2008) Prostate cancer. Lancet 371:1710–1721

Darnell JE Jr (1997) STATs and gene regulation. Science 277: 1630–1635

Dimopoulos MA, Anagnostopoulos A, Weber D (2003) Treatment of plasma cell dyscrasias with thalidomide and its derivatives. J Clin Oncol 21:4444–4454

Duvoix A, Morceau F, Delhalle S, Schmitz M, Schnekenburger M, Galteau MM, Dicato M, Diederich M (2003) Induction of apoptosis by curcumin: mediation by glutathione S-transferase P1–1 inhibition. Biochem Pharmacol 66:1475–1483

Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, Turkson J, Oshiro M, Kothapalli R, Li Y, Wang JM, Yang-Yen HF, Karras J, Jove R, Loughran TP Jr (2001) Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. J Clin Invest 107:351–362

Fecteau JF, Bharati IS, O'Hayre M, Handel TM, Kipps TJ, Messmer D (2011) Sorafenib-induced apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells is associated with downregulation of RAF and Mcl-1. Mol Med

Glaser T, Winter S, Groscurth P, Safayhi H, Sailer ER, Ammon HP, Schabet M, Weller M (1999) Boswellic acids and malignant glioma: induction of apoptosis but no modulation of drug sensitivity. Br J Cancer 80:756–765

Gojo I, Zhang B, Fenton RG (2002) The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol induces apoptosis in multiple myeloma cells through transcriptional repression and down-regulation of Mcl-1. Clin Cancer Res 8:3527–3538

Grad JM, Zeng XR, Boise LH (2000) Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT. Curr Opin Oncol 12:543–549

Grandage VL, Gale RE, Linch DC, Khwaja A (2005) PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kappaB, Mapkinase and p53 pathways. Leukemia 19:586–594

Grivennikov SI, Karin M (2010) Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. Cytokine Growth Factor Rev 21:11–19

Hao W, Hu Y, Niu C, Huang X, Chang CP, Gibbons J, Xu J (2008) Discovery of the catechol structural moiety as a Stat3 SH2 domain inhibitor by virtual screening. Bioorg Med Chem Lett 18:4988–4992

Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. Biochem J 334(Pt 2):297–314

Hoernlein RF, Orlikowsky T, Zehrer C, Niethammer D, Sailer ER, Simmet T, Dannecker GE, Ammon HP (1999) Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid induces apoptosis in HL-60 and CCRF-CEM cells and inhibits topoisomerase I. J Pharmacol Exp Ther 288: 613–619

Horita M, Andreu EJ, Benito A, Arbona C, Sanz C, Benet I, Prosper F, Fernandez-Luna JL (2000) Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. J Exp Med 191:977–984

Ilaria RL Jr, Van Etten RA (1996) P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. J Biol Chem 271: 31704–31710

Ishdorj G, Johnston JB, Gibson SB (2010) Inhibition of constitutive activation of STAT3 by curcurbitacin-I (JSI-124) sensitized human B-leukemia cells to apoptosis. Mol Cancer Ther 9: 3302–3314

Jing N, Tweardy DJ (2005) Targeting Stat3 in cancer therapy. Anticancer Drugs 16:601–607

Jing N, Zhu Q, Yuan P, Li Y, Mao L, Tweardy DJ (2006) Targeting signal transducer and activator of transcription 3 with G-quartet oligonucleotides: a potential novel therapy for head and neck cancer. Mol Cancer Ther 5:279–286

Kannaiyan R, Shanmugam MK, Sethi G (2011a) Molecular targets of celastrol derived from Thunder of God Vine: potential role in the treatment of inflammatory disorders and cancer. Cancer Lett 303:9–20

Kannaiyan R, Hay HS, Rajendran P, Li F, Shanmugam MK, Vali S, Abbasi T, Kapoor S, Sharma A, Kumar AP, Chng WJ, Sethi G (2011b) Celastrol inhibits proliferation and induces chemosensitization through down-regulation of NF-kappaB and STAT3 regulated gene products in multiple myeloma cells. Br J Pharmacol 164(5):1506–1521

Kassi E, Sourlingas TG, Spiliotaki M, Papoutsi Z, Pratsinis H, Aligiannis N, Moutsatsou P (2009) Ursolic acid triggers apoptosis and Bcl-2 downregulation in MCF-7 breast cancer cells. Cancer Invest 27:723–733

Konig A, Schwartz GK, Mohammad RM, Al-Katib A, Gabrilove JL (1997) The novel cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol downregulates Bcl-2 and induces growth arrest and apoptosis in chronic B-cell leukemia lines. Blood 90:4307–4312

Kunnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB (2008) Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. Cancer Lett 269:199–225

Lee SO, Lou W, Qureshi KM, Mehraein-Ghomi F, Trump DL, Gao AC (2004) RNA interference targeting Stat3 inhibits growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells. Prostate 60: 303–309

Leong PL, Andrews GA, Johnson DE, Dyer KF, Xi S, Mai JC, Robbins PD, Gadiparthi S, Burke NA, Watkins SF, Grandis JR (2003) Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. Proc Natl Acad Sci USA 100:4138–4143

Li F, Sethi G (2010) Targeting transcription factor NF-kappaB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. Biochim Biophys Acta 1805:167–180

Li F, Rajendran P, Sethi G (2010a) Thymoquinone inhibits proliferation, induces apoptosis and chemosensitizes human multiple myeloma cells through suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation pathway. Br J Pharmacol 161:541–554

Li F, Fernandez PP, Rajendran P, Hui KM, Sethi G (2010b) Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits STAT3 signaling pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human hepatocellular carcinoma cells. Cancer Lett 292: 197–207

Liu J (1995) Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. J Ethnopharmacol 49:57–68

Liu JJ, Nilsson A, Oredsson S, Badmaev V, Zhao WZ, Duan RD (2002a) Boswellic acids trigger apoptosis via a pathway dependent on caspase-8 activation but independent on Fas/Fas ligand interaction in colon cancer HT-29 cells. Carcinogenesis 23:2087–2093

Liu P, Kimmoun E, Legrand A, Sauvanet A, Degott C, Lardeux B, Bernuau D (2002b) Activation of NF-kappa B, AP-1 and STAT transcription factors is a frequent and early event in human hepatocellular carcinomas. J Hepatol 37:63–71

Manu KA, Kuttan G (2008) Ursolic acid induces apoptosis by activating p53 and caspase-3 gene expressions and suppressing NF-kappaB mediated activation of bcl-2 in B16F–10 melanoma cells. Int Immunopharmacol 8:974–981

Martin P, Papayannopoulou T (1982) HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression. Science 216:1233–1235

Mertens C, Zhong M, Krishnaraj R, Zou W, Chen X, Darnell JE Jr (2006) Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain. Genes Dev 20:3372–3381

Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, Leeder JS, Freedman M, Cohen A, Gazit A, Levitzki A, Roifman CM (1996) Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. Nature 379:645–648

Nagel-Wolfrum K, Buerger C, Wittig I, Butz K, Hoppe-Seyler F, Groner B (2004) The interaction of specific peptide aptamers with the DNA binding domain and the dimerization domain of the transcription factor Stat3 inhibits transactivation and induces apoptosis in tumor cells. Mol Cancer Res 2:170–182

Nelson DM, Joseph B, Hillion J, Segal J, Karp JE, Resar LM (2011) Flavopiridol induces BCL-2 expression and represses oncogenic transcription factors in leukemic blasts from adults with refractory acute myeloid leukemia. Leuk Lymphoma 52: 1999–2006

Niu G, Wright KL, Ma Y, Wright GM, Huang M, Irby R, Briggs J, Karras J, Cress WD, Pardoll D, Jove R, Chen J, Yu H (2005) Role of Stat3 in regulating p53 expression and function. Mol Cell Biol 25:7432–7440

Niwa Y, Kanda H, Shikauchi Y, Saiura A, Matsubara K, Kitagawa T, Yamamoto J, Kubo T, Yoshikawa H (2005) Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma. Oncogene 24:6406–6417

Ozawa Y, Williams AH, Estes ML, Matsushita N, Boschelli F, Jove R, List AF (2008) Src family kinases promote AML cell survival through activation of signal transducers and activators of transcription (STAT). Leuk Res 32:893–903

Pandey MK, Sung B, Ahn KS, Aggarwal BB (2009) Butein suppresses constitutive and inducible signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 activation and STAT3-regulated gene products through the induction of a protein tyrosine phosphatase SHP-1. Mol Pharmacol 75:525–533

Park YS, Lee JH, Harwalkar JA, Bondar J, Safayhi H, Golubic M (2002) Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA) is cytotoxic for meningioma cells and inhibits phosphorylation of the extracellular-signal regulated kinase 1 and 2. Adv Exp Med Biol 507:387–393

Patel V, Senderowicz AM, Pinto D Jr, Igishi T, Raffeld M, Quintanilla-Martinez L, Ensley JF, Sausville EA, Gutkind JS (1998) Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, suppresses the growth of head and neck squamous cell carcinomas by inducing apoptosis. J Clin Invest 102:1674–1681

Pathak AK, Bhutani M, Nair AS, Ahn KS, Chakraborty A, Kadara H, Guha S, Sethi G, Aggarwal BB (2007) Ursolic acid inhibits STAT3 activation pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human multiple myeloma cells. Mol Cancer Res 5:943–955

Patlolla JM, Raju J, Swamy MV, Rao CV (2006) Beta-escin inhibits colonic aberrant crypt foci formation in rats and regulates the cell cycle growth by inducing p21(waf1/cip1) in colon cancer cells. Mol Cancer Ther 5:1459–1466

Paulson M, Press C, Smith E, Tanese N, Levy DE (2002) IFN-Stimulated transcription through a TBP-free acetyltransferase complex escapes viral shutoff. Nat Cell Biol 4:140–147

Pellegrini S, Dusanter-Fourt I (1997) The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). Eur J Biochem 248: 615–633

Pettersson M, Jernberg-Wiklund H, Larsson LG, Sundstrom C, Givol I, Tsujimoto Y, Nilsson K (1992) Expression of the bcl-2 gene in human multiple myeloma cell lines and normal plasma cells. Blood 79:495–502

Prakobwong S, Khoontawad J, Yongvanit P, Pairojkul C, Hiraku Y, Sithithaworn P, Pinlaor P, Aggarwal BB, Pinlaor S (2011a) Curcumin decreases cholangiocarcinogenesis in hamsters by suppressing inflammation-mediated molecular events related to multistep carcinogenesis. Int J Cancer 129:88–100

Prakobwong S, Gupta SC, Kim JH, Sung B, Pinlaor P, Hiraku Y, Wongkham S, Sripa B, Pinlaor S, Aggarwal BB (2011b) Curcumin suppresses proliferation and induces apoptosis in human biliary cancer cells through modulation of multiple cell signaling pathways. Carcinogenesis 32:1372–1380

Rajendran P, Li F, Manu KA, Shanmugam MK, Loo SY, Kumar AP, Sethi G (2011a) gamma-Tocotrienol is a novel inhibitor of constitutive and inducible STAT3 signalling pathway in human hepatocellular carcinoma: potential role as an antiproliferative, pro-apoptotic and chemosensitizing agent. Br J Pharmacol 163: 283–298

Rajendran P, Ong TH, Chen L, Li F, Shanmugam MK, Vali S, Abbasi T, Kapoor S, Sharma A, Kumar AP, Hui KM, Sethi G (2011b) Suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation by butein inhibits growth of human hepatocellular carcinoma in vivo. Clin Cancer Res 17:1425–1439

Rascle A, Johnston JA, Amati B (2003) Deacetylase activity is required for recruitment of the basal transcription machinery and transactivation by STAT5. Mol Cell Biol 23:4162–4173

Ren Z, Cabell LA, Schaefer TS, McMurray JS (2003) Identification of a high-affinity phosphopeptide inhibitor of Stat3. Bioorg Med Chem Lett 13:633–636

Schindler C, Plumlee C (2008) Interferons pen the JAK-STAT pathway. Semin Cell Dev Biol 19:311–318

Schindler C, Levy DE, Decker T (2007) JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. J Biol Chem 282:20059–20063

Schust J, Sperl B, Hollis A, Mayer TU, Berg T (2006) Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. Chem Biol 13:1235–1242

Sedlacek H, Czech J, Naik R, Kaur G, Worland P, Losiewicz M, Parker B, Carlson B, Smith A, Senderowicz A, Sausville E (1996) Flavopiridol (L86 8275; NSC 649890), a new kinase inhibitor for tumor therapy. Int J Oncol 9:1143–1168

Shanmugam MK, Manu KA, Ong TH, Ramachandran L, Surana R, Bist P, Lim LH, Kumar AP, Hui KM, Sethi G (2011a) Inhibition of CXCR4/CXCL12 signaling axis by ursolic acid leads to suppression of metastasis in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. Int J Cancer 129(7):1552–1563

Shanmugam MK, Rajendran P, Li F, Nema T, Vali S, Abbasi T, Kapoor S, Sharma A, Kumar AP, Ho PC, Hui KM, Sethi G (2011b) Ursolic acid inhibits multiple cell survival pathways leading to suppression of growth of prostate cancer xenograft in nude mice. J Mol Med 89:713–727

Shao Y, Ho CT, Chin CK, Badmaev V, Ma W, Huang MT (1998) Inhibitory activity of boswellic acids from Boswellia serrata against human leukemia HL-60 cells in culture. Planta Med 64: 328–331

Shin DS, Kim HN, Shin KD, Yoon YJ, Kim SJ, Han DC, Kwon BM (2009) Cryptotanshinone inhibits constitutive signal transducer and activator of transcription 3 function through blocking the dimerization in DU145 prostate cancer cells. Cancer Res 69: 193–202

Siddiquee K, Zhang S, Guida WC, Blaskovich MA, Greedy B, Lawrence HR, Yip ML, Jove R, McLaughlin MM, Lawrence NJ, Sebti SM, Turkson J (2007a) Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity. Proc Natl Acad Sci USA 104: 7391–7396

Siddiquee KA, Gunning PT, Glenn M, Katt WP, Zhang S, Schrock C, Sebti SM, Jove R, Hamilton AD, Turkson J (2007b) An oxazole-based small-molecule Stat3 inhibitor modulates Stat3 stability and processing and induces antitumor cell effects. ACS Chem Biol 2:787–798

Song H, Wang R, Wang S, Lin J (2005) A low-molecular-weight compound discovered through virtual database screening inhibits Stat3 function in breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA 102:4700–4705

Spiekermann K, Biethahn S, Wilde S, Hiddemann W, Alves F (2001) Constitutive activation of STAT transcription factors in acute myelogenous leukemia. Eur J Haematol 67:63–71

Staerk J, Kallin A, Royer Y, Diaconu CC, Dusa A, Demoulin JB, Vainchenker W, Constantinescu SN (2007) JAK2, the JAK2 V617F mutant and cytokine receptors. Pathol Biol (Paris) 55: 88–91

Sun J, Blaskovich MA, Jove R, Livingston SK, Coppola D, Sebti SM (2005) Cucurbitacin Q: a selective STAT3 activation inhibitor with potent antitumor activity. Oncogene 24:3236–3245

Sun C, Zhang M, Shan X, Zhou X, Yang J, Wang Y, Li-Ling J, Deng Y (2010) Inhibitory effect of cucurbitacin E on pancreatic cancer cells growth via STAT3 signaling. J Cancer Res Clin Oncol 136: 603–610

Syrovets T, Gschwend JE, Buchele B, Laumonnier Y, Zugmaier W, Genze F, Simmet T (2005) Inhibition of IkappaB kinase activity by acetyl-boswellic acids promotes apoptosis in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells in vitro and in vivo. J Biol Chem 280:6170–6180

Tan SM, Li F, Rajendran P, Kumar AP, Hui KM, Sethi G (2010) Identification of beta-escin as a novel inhibitor of signal transducer and activator of transcription 3/Janus-activated kinase 2 signaling pathway that suppresses proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. J Pharmacol Exp Ther 334:285–293

Timofeeva OA, Gaponenko V, Lockett SJ, Tarasov SG, Jiang S, Michejda CJ, Perantoni AO, Tarasova NI (2007) Rationally designed inhibitors identify STAT3 N-domain as a promising anticancer drug target. ACS Chem Biol 2:799–809

Tu Y, Renner S, Xu F, Fleishman A, Taylor J, Weisz J, Vescio R, Rettig M, Berenson J, Krajewski S, Reed JC, Lichtenstein A (1998) BCL-X expression in multiple myeloma: possible indicator of chemoresistance. Cancer Res 58:256–262

Turkson J, Ryan D, Kim JS, Zhang Y, Chen Z, Haura E, Laudano A, Sebti S, Hamilton AD, Jove R (2001) Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. J Biol Chem 276:45443–45455

Turkson J, Zhang S, Palmer J, Kay H, Stanko J, Mora LB, Sebti S, Yu H, Jove R (2004a) Inhibition of constitutive signal transducer and activator of transcription 3 activation by novel platinum complexes with potent antitumor activity. Mol Cancer Ther 3: 1533–1542

Turkson J, Kim JS, Zhang S, Yuan J, Huang M, Glenn M, Haura E, Sebti S, Hamilton AD, Jove R (2004b) Novel peptidomimetic inhibitors of signal transducer and activator of transcription 3 dimerization and biological activity. Mol Cancer Ther 3: 261–269

Turkson J, Zhang S, Mora LB, Burns A, Sebti S, Jove R (2005) A novel platinum compound inhibits constitutive Stat3 signaling and induces cell cycle arrest and apoptosis of malignant cells. J Biol Chem 280:32979–32988

Waris G, Siddiqui A (2005) Hepatitis C virus stimulates the expression of cyclooxygenase-2 via oxidative stress: role of prostaglandin E2 in RNA replication. J Virol 79:9725–9734

Weidler M, Rether J, Anke T, Erkel G (2000) Inhibition of interleukin-6 signaling by galiellalactone. FEBS Lett 484:1–6

Yoshida T, Hanada T, Tokuhisa T, Kosai K, Sata M, Kohara M, Yoshimura A (2002) Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. J Exp Med 196:641–653

Yu H, Pardoll D, Jove R (2009) STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. Nat Rev Cancer 9:798–809

Yue P, Turkson J (2009) Targeting STAT3 in cancer: how successful are we? Expert Opin Investig Drugs 18:45–56

Zhang C, Li B, Zhang X, Hazarika P, Aggarwal BB, Duvic M (2010) Curcumin selectively induces apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cell lines and patients' PBMCs: potential role for STAT-3 and NF-kappaB signaling. J Invest Dermatol 130: 2110–2119

Zhao W, Zhang T, Qu B, Wu X, Zhu X, Meng F, Gu Y, Shu Y, Shen Y, Sun Y, Xu Q (2011) Sorafenib induces apoptosis in HL60 cells by inhibiting Src kinase-mediated STAT3 phosphorylation. Anticancer Drugs 22:79–88

Zhou J, Smith DK, Lu L, Poon VK, Ng F, Chen DQ, Huang JD, Yuen KY, Cao KY, Zheng BJ (2009) A non-synonymous single nucleotide polymorphism in IFNAR1 affects susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. J Viral Hepat 16:45–52

RESUME

L'acide valproïque (VPA) est un inhibiteur des histones désacétylases (HDACi), qui présente des propriétés anti-tumorales sur différents types de cancers. Son utilisation depuis plusieurs décennies comme médicament antiépileptique a révélé des effets secondaires, notamment sur le système hématopoïétique. Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à l'effet du VPA sur les réseaux microARN (miR)/Facteurs de transcription (FT) spécifiquement impliqués dans la régulation des voies de différenciation érythro-mégacaryocytaires. Nous montrons que le VPA est capable d'inhiber la différenciation érythroïde dans les cellules érythroleucémiques humaines TF1 et K562 et dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH) $CD34^+$, stimulées par l'érythropoïétine recombinante (Epo) ou par l'aclacinomycine A. Cette inhibition se traduit par une diminution de l'expression de la glycophorine A, de la γ-globine, des miR-144/451 et du FT GATA-1. L'inhibition du pré-miR-144 suggère que le VPA est capable de réguler l'expression du gène miR-144/451 au niveau transcriptionnel, *via* GATA-1. Dans les cellules Epo/$CD34^+$, le VPA induit l'augmentation du FT PU.1 en accord avec l'inhibition du miR-155 et favorise son interaction avec GATA-1 pour inhiber son activité. L'utilisation d'un analogue du VPA, sans activité HDACi (Valpromide) et d'un inhibiteur d'HDAC de classe I, le MS-275, a montré que l'activité HDACi du VPA n'est pas requise pour l'inhibition de la différenciation érythroïde. Le VPA affecte également la voie mégacaryocytaire issue d'un progéniteur commun aux cellules érythroïdes. Dans la lignée mégacaryoblastique Meg-01, le VPA induit des modifications morphologiques du type mégacaryocytaire, une augmentation du marqueur CD61, du FT GATA-2 et du miR-27a. En revanche, l'expression du FT GATA-1 et des miR-144/451 diminuent. L'augmentation du miR-27a coïncide avec la diminution de l'expression de l'ARNm du FT RUNX1, en accord avec l'induction de la voie mégacaryocytaire. En conclusion, le VPA est capable de moduler le programme de différenciation érythro-mégacaryocytaire, à travers un micro réseau de régulation miR/FT.

Mots clés: Acide valproïque, différenciation hématopoïétique, GATA-1, miR-144/451

ABSTRACT

Valproic acid (VPA), a histone deacetylase inhibitor (HDACi), exhibits anti-cancer properties against several tumor types. Its use as an anti-epileptic drug for several decades reveled side effects at the hematological level. In this study, we analyzed the effect of VPA on an erythro-megakaryocyte-specific miR/transcription factors network. VPA inhibited erythroid differentiation in the erythroleukemia cell lines TF1 and K562 as well as in $CD34^+$/hematopoietic stem cells (HSCs), induced by the recombinant erythropoietin (Epo) or aclacinomycin. This inhibition was characterized by glycophorin-A, γ-globin and GATA-1/miR-144/451 down-regulation. Inhibition of pre-miR-144 expression suggested that VPA regulates transcription of the miR-144/451 gene through GATA-1. In Epo-stimulated HSCs, VPA induced PU.1 expression in correlation with miR-155 inhibition and promoted GATA-1/PU.1 interaction. The use of valpromide, a VPA analogue without HDACi activity and the class-I HDACi MS-275, showed that HDAC inhibition by VPA was not required for its inhibitory activity on erythropoiesis. VPA also induced megakaryocyte features in Meg-01 cells, at both cellular and molecular levels. Notably, CD61, GATA-2 and miR-27a were over-expressed. RUNX1 mRNA expression and GATA-1/miR-144/451 axis decreased in accordance with megakaryocyte differentiation. In conclusion, VPA is able to modulate erythro-megakaryocytic differentiation program, through a regulatory micro-network involving miRs and TFs.

Key words: Valproic acid, hematopoietic differentiation, GATA-1, miR-144/451