

Université de Montréal

Mécanisme d'action du PBI-1402 impliqué dans l'expansion des progéniteurs érythroïdes humains et murins

Par

Sabrina Vinet

Programme de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise (MSc) en Sciences Biomédicales

Août 2008

©Sabrina Vinet, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Mécanisme d'action du PBI-1402 impliqué dans l'expansion des progéniteurs
érythroïdes humains et murins**

Présenté par :

Sabrina Vinet

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Denis Claude Roy	Directeur de recherche
Dr Édouard Kouassi	Président du jury
Dr Luis Fernando Congote	Membre du jury

SOMMAIRE

Une des complications importantes d'un traitement intensif de chimio/radio-thérapie est l'aplasie de la moelle osseuse qui peut persister longtemps même après une greffe de cellules souches. Le PBI-1402 est un petit lipide qui a été associé à la diminution de l'apoptose des neutrophiles induite par des agents cytotoxiques. Nos travaux ont démontré que la culture *in vitro* de progéniteurs hématopoïétiques humains en présence de PBI-1402 induit une augmentation significative du nombre de progéniteurs érythroïdes (PEryth) ($p < 0,05$). En évaluant la sensibilité des PEryth à l'érythropoïétine (Epo), nous avons démontré que le PBI-1402 n'a pas d'effet sensibilisateur et que les cellules répondent de façon similaire aux cellules contrôles. De plus, la combinaison de l'Epo et du « stem cell factor » avec le PBI-1402 permet de prolonger et d'augmenter l'activation d'ERK1/2 ($p < 0,05$), un important signal mitogène. Cet effet est associé à une inhibition de l'activation de la phosphatase MKP-1 dans les cellules exposées au PBI-1402. Nous démontrons aussi la capacité du PBI-1402 à amplifier la prolifération des PEryth et sa capacité à réduire la durée et l'intensité de l'anémie dans un modèle *in vivo* murin. Des souris ayant reçu une dose létale d'irradiation et subi une transplantation syngénique de moelle osseuse, ont été traitées oralement avec le PBI-1402 pendant 14 jours. Ces souris démontrent une réduction significative de l'anémie post-transplantation versus les souris contrôle ($p < 0,05$). De plus, la moelle osseuse des souris traitées au PBI-1402 présente un nombre de BFU-E et CFU-E plus élevé comparativement au contrôle. Ces résultats démontrent donc le potentiel du PBI-1402 à réduire l'anémie post-transplantation et accélérer la reconstitution érythroïde.

Mots clés: Anémie, BFU-E, CFU-E, Epo, ERK1/2, Progéniteurs érythroïdes, Reconstitution érythroïde, PBI-1402, SCF, MKP-1

ABSTRACT

One of the most important complications of intensive radiotherapy or chemotherapy is cytopenia, which can persist for significant amount of time even after stem cell transplantation. PBI-1402, a small lipid, was previously shown to be associated with decreased neutrophil apoptosis caused by cytotoxic agents. Our work has shown that day primary human hematopoietic cell *in vitro* culture in the presence of PBI-1402 resulted in an increased number of erythroid progenitors ($p<0,05$). Dose-response experiments evaluating sensitivity to erythropoietin (Epo) of cells exposed to PBI-1402 indicated that PBI-1402 did not have a sensitizing effect and that both treated and control cells respond similarly to Epo. In addition, PBI-1402, used in combination with stem cell factor (SCF) and Epo, enhanced and prolonged ERK1/2 phosphorylation ($p<0.05$), a signalling pathway important for erythroid progenitor cell proliferation. This effect was associated with a decrease of the phosphatase MKP-1 activation in PBI-1402 exposed cells. This translated into and increased proliferation of erythroid progenitors as well as a reduced duration and level of anemia in an *in vivo* murine transplantation model. Lethally irradiated mice that received syngeneic stem cell transplantation were treated orally with PBI-1402 for 14 days. These mice demonstrated a significant reduction in post-transplantation anemia in a dose dependent manner compared to control (vehicle)($p<0.05$). Moreover, PBI-1402-treated mice harboured significantly higher numbers of BFU-E and CFU-E in bone marrow compared to control ($p<0.05$). These results demonstrate that PBI-1402 treatment significantly reduced transplantation-induced anemia with concomitant acceleration in erythroid recovery.

Key words: Anemia, BFU-E, CFU-E, Epo, ERK1/2, Erythroid progenitors, Erythroid reconstitution, PBI-1402, SCF, MKP-1

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	I
1 - CANCER ET AUTRES PATHOLOGIES.....	2
1.1 – Traitements	2
1.2 - Conséquences des traitements	3
1.2.1 – Anémie.....	3
2 - GREFFE DE CELLULES SOUCHES.....	5
2.1 - Greffes allogéniques	5
2.2 - Greffes autologues	6
3 - SOURCES DE CELLULES SOUCHES.....	8
3.1 - Moelle Osseuse	9
3.2 - Cellules souches mobilisées dans le sang	9
4 – HÉMATOPOÏÈSE.....	11
4.1 - Cellules souches hématopoïétiques (CSH)	11
4.1.1 - Cellules CD34 positives.....	13
4.2 - Progéniteurs hématopoïétiques	15
4.2.1 - Progéniteurs, précurseurs et cellules matures.....	15
5 – ÉRYTHROPOÏÈSE.....	17
5.1 - « Burst Forming Unit-Erythroid » (BFU-E)	17
5.2 – « Colony forming unit-Erythroid » (CFU-E)	19
6- CYTOKINES IMPORTANTES.....	20
6.1 – « Stem Cell Factor » (SCF)	20
6.2 - Érythropoïétine (Epo)	21
6.3 Autres cytokines importantes	23
6.3.1 – Hormones et lipides.....	24
7 - SIGNALISATION CELLULAIRE.....	25
7.1 - Récepteurs	25
7.1.1 - Récepteur du SCF.....	25
7.1.2 - Récepteur de l'Epo (EpoR).....	28
7.2 Coopération entre le SCF et l'Epo	30
7.4 Voie de signalisation des MAPK	32
7.4.1 Phosphatases spécifiques aux MAPK (MKP).....	34
8- PBI-1402.....	35
8.1 - Récentes découvertes	35
8.2 - Applications cliniques	36
9- DESCRIPTION DU PROJET DE MAÎTRISE.....	37
9.1 - Procédure expérimentale	37
9.1.1 - Différenciation des CD34+ en progéniteurs érythroïdes.....	38
9.1.2 - Évaluation du mécanisme d'action du PBI-1402.....	38
9.1.3 - Évaluation des progéniteurs érythroïdes humains et murins.....	38
9.1.4 - Évaluation de la réponse au PBI-1402 dans un modèle murin.....	39
9.2 – Objectifs principaux du projet	39
ARTICLE.....	40
DISCUSSION DES RÉSULTATS.....	80
10 - DISCUSSION.....	81
10.1 – Pertinence du projet	82
10.2 – But du projet et résultats obtenus	82
11 – EXPANSION DES PROGÉNITEURS ÉRYTHROÏDES HUMAINS.....	84
11.1 – Expansion des PEryth humains par le PBI-1402 à partir de sang mobilisé	84
11.2 – Mise au point d'un système de culture pour l'expansion des PEryth	85
11.2.1 – Le PBI-1402 induit l'expansion des PEryth.....	87

12 – MÉCANISME D’ACTION DU PBI-1402.....	91
12.1 – <i>Activation prolongée d’ERK1/2 par le PBI-1402</i> 92	
12.2 – <i>Y a-t-il d’autres voies impliquées?</i> 94	
12.3 – <i>Inhibition de la phosphatase MKP-1 par le PBI-1402</i> 95	
12.4 – <i>Mécanisme d’action du PBI-1402 sur une culture à long terme</i> 96	
13 – MODÈLE IN VIVO	97
13.1 – <i>Amélioration de l’anémie chez les souris traitées au PBI-1402</i> 97	
13.2 – <i>Expansion des PEryth murins par le PBI-1402</i> 98	
14 – CONCLUSION GÉNÉRALE	100
ANNEXES.....	102
BIBLIOGRAPHIE	106

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cellules souches.....	8
Figure 2 : Hématopoïèse.....	12
Figure 3 : Érythropoïèse.....	18
Figure 4 : Voie de signalisation de KIT	27
Figure 5 : Voie de signalisation de l'EpoR	29
Figure 6 : Coopération des voies de signalisation de SCF et de l'Epo	31
Figure 7 : Voie conventionnelle des MAPK	33

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

a.a : Acide Aminée

ASE : Agent Stimulant l'Érythropoïèse

BFU-E: «Burst-Forming Unit-Erythrocyte»

CFU-E: «Colony Forming Unit-Erythrocyte»

CFU-G: «Colony Forming Unit-Granulocyte»

CFU-GEMM: «Colony Forming Unit-Granulocyte-Erythrocyte-Macrophage-Megakaryocyte»

CFU-GM: «Colony Forming Unit-Granulocyte-Macrophage»

CFU-M: «Colony Forming Unit-Macrophage»

CFU-S : «Colony Forming Unit-spleen»

CMP : «Common myeloid progenitor»

CS : Cellules Souches

CSH: Cellules Souches Hématopoïétiques

Dex : Dexaméthasone

rhEpo: Érythropoïétine recombinante humaine

Epo: Érythropoïétine

EpoR : Récepteur de l'Érythropoïétine

ERK1/2 : « Extracellular signal-regulated kinase 1/ 2 »

FCH : Facteur de Croissance Hématopoïétique

FDA : « Food and Drug Administration »

G-CSF : « Granulocyte Colony-Stimulating Factor »

GCSH : Greffe de Cellules Souches Hématopoïétiques

GM-CSF : « Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor »

G-PBMC: « G-CSF stimulated- peripheral blood mononuclear cells »

GVHD: « Graft versus Host Disease »

Hb : Hémoglobine

IEG : « Immediate-Early Genes »

IGF-1 : « Insulin Growth Factor-1 »

IL-1 : Interleukine-1

IL-3: Interleukine-3

IL-4: Interleukine-4

IL-6: Interleukine-6

IL-12: Interleukine-12

KO : « Knock-out »

MAPK : « Mitogen-activated Protein Kinase »

MAPKK: « Mitogen-activated Protein Kinase Kinase »

MAPKKK: « Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase»

MC: « Méthocult media »

MKP-1 : « MAPK phosphatase-1 »

MO: Moelle Osseuse

PEryth: Progéniteurs érythroïdes

PI3K: Phosphatidylinositol-3 Kinase

PKC: Protéine Kinase C

PLC: Phospholipase C

RTK: Récepteur Tyrosine Kinase

SCF: « Stem Cell Factor »

STAT: « Signal Transducer and Activator of Transcription »

REMERCIEMENT

Je désire remercier le Dr Denis Claude Roy pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir donné l'opportunité de faire mes études de 2^e cycle. Je le remercie également pour son appui et sa confiance au cours des trois dernières années.

Je remercie aussi le Dr Gorazd Krosl pour son appui intellectuel et sa disponibilité. Sans lui, mon article n'aurait pu voir le jour. Je tiens aussi à souligner plus particulièrement l'aide que m'a apportée Marie-Josée Morin. Je la remercie pour son aide précieuse et indispensable, son expérience et sa confiance, mais aussi pour sa présence, sa générosité ainsi que son amitié. Je remercie aussi Mireille Guérin, Jean-Philippe Bastien et Cynthia Thérien ainsi tous les membres du laboratoire avec qui j'ai tissé des liens solides et espérons-le, durables.

Je remercie également Prometic BioSciences Inc pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet.

En dernier lieu, je tiens à remercier Dave Lemieux pour son amour et son soutien psychologique, ainsi que tous les membres extraordinaires de ma famille pour leur confiance, leur compréhension et leur appui tout au long de mes études.

INTRODUCTION

1 - Cancer et autres pathologies

Chaque année, le cancer continue de progresser au Canada. Les *Statistiques canadiennes sur le cancer* estiment qu'en 2008, au Québec, 42 000 nouveaux cas (167 000 au Canada) seront diagnostiqués [1], ce qui en fait la première cause de mortalité en Amérique du Nord. Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer, tant chez les femmes que chez les hommes; le cancer colorectal se situe au deuxième rang. Les cancers hématologiques, incluant la leucémie, sont aussi parmi les premières causes de mortalité. Il existe plus d'une douzaine de types de leucémie dont les quatre plus fréquentes sont la leucémie myéloïde aiguë ou chronique et la leucémie lymphoblastique aiguë ou chronique. Les causes de ces maladies ne sont pas tout à fait connues. Cependant, les facteurs de risque pour le développement d'un cancer sont : la prédisposition génétique, l'exposition à de fortes doses de radiation, certains virus, de même qu'une exposition prolongée à certains produits chimiques [2].

1.1 – Traitements

Pour éradiquer un cancer, plusieurs traitements sont disponibles. La chirurgie est souvent nécessaire pour éliminer une tumeur solide. Cette chirurgie est souvent suivie d'un traitement de chimiothérapie et/ou radiothérapie qui peut varier en intensité afin d'éliminer toutes cellules cancéreuses résiduelles. La chimiothérapie emploie des composés hautement toxiques qui diffèrent selon le type de cancer. Ces

produits s'attaquent aux cellules cancéreuses mais aussi aux cellules en division rapide comme celles des follicules pileux, de la peau, du système digestif et du sang. La radiothérapie, quant à elle, vise à détruire les cellules malignes en exposant la région affectée à des radiations de divers types comme les rayons X, gamma ou bêta.

1.2 - Conséquences des traitements

Lorsque le traitement exige de fortes doses de chimio- ou radiothérapie, la greffe de moelle osseuse ou de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est souvent nécessaire afin de fournir des cellules souches fonctionnelles au système hématopoïétique. Suite à ces traitements intensifs, les patients font alors face à des cytopénies (anémie, neutropénie et thrombopénie), ainsi que des risques d'infections et d'hémorragies. Comme le retour au niveau physiologique des cellules hématopoïétiques peut prendre jusqu'à 8 semaines divers traitements doivent être envisagés [3].

1.2.1 – Anémie

Bien que la chimio/radiothérapie amène la destruction des cellules cancéreuses, elle cause aussi l'aplasie des cellules normales de la moelle osseuse (MO). Cette aplasie entraîne une carence de plusieurs types cellulaires dont les érythrocytes. L'anémie sévère causée par les traitement ou simplement l'anémie découlant d'un problème génétique entraîne de nombreux symptômes comme la

fatigue, des vertiges et la dyspnée [4]. Elle peut aussi avoir de plus graves conséquences et entraîner un arrêt cardiaque. Pour remédier à ces effets indésirables, les patients devront souvent recevoir des transfusions sanguines. La diminution de la qualité de vie du patient et les risques d'infections sont d'autres effets indésirables qui viennent s'ajouter à ceux du traitement initial. Depuis quelques années, des agents stimulant l'érythropoïèse (ASE) sont aussi utilisés pour traiter l'anémie [5]. Les érythropoïétines recombinantes (rhEpo), comme l'Epoetin ou le Darbepoetin, font partie de ces agents stimulants. Ils permettent de favoriser la production de progéniteurs érythroïdes afin d'augmenter et d'accélérer la production des érythrocytes. Par contre, ce type de traitement doit être utilisé avec précaution. Un avertissement pour l'utilisation judicieuse des ASE chez les patients ne recevant pas de chimiothérapie ou ayant une anémie associée à un cancer hématologique a été émis par la FDA [6, 7]. En effet, le risque de thromboses vasculaires, la diminution de la survie des patients et le mauvais contrôle des tumeurs suite à ce type de traitement ont été observés au cours des dernières années, d'où la nécessité d'identifier de nouvelles avenues thérapeutiques [8-10].

2 - Greffe de cellules souches

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH) est souvent nécessaire afin de traiter des patients atteints de diverses maladies d'origine hématologique, comme les leucémies et les lymphomes, d'origine immunologique, comme la sclérodermie et l'arthrite rhumatoïde sévère, ou de cause génétique comme les déficits enzymatiques et les maladies de surcharge [11, 12]. Elle vise principalement à repeupler le système hématopoïétique en cellules souches (CS). La reconstitution du pool de CS est l'étape la plus importante lors d'une GCSH, car les patients sont souvent immunosupprimés et sont vulnérables aux pathogènes. Ces patients doivent donc demeurer à l'hôpital jusqu'à ce que leur niveau de cellules immunitaires ait suffisamment récupéré. Les CS qui sont greffées doivent être compatibles avec le receveur afin que celui-ci n'ait pas de réaction de rejet. Il existe plusieurs types de GCSH dont celles dites autologues et celles dites allogéniques.

2.1 - Greffes allogéniques

Le principe d'une GCSH allogénique est que les CS d'un donneur provenant de la même espèce que le receveur, mais présentant un bagage génétique différent, seront infusées au patient. Lorsqu'on effectue une greffe de ce type, on doit s'assurer que le receveur et le donneur soient compatibles afin d'éviter les complications comme le rejet. Pour ce faire, la compatibilité entre les deux est basée sur le phénotype HLA, le système d'histocompatibilité leucocytaire, qui établit le degré de compatibilité entre le donneur et le receveur [13]. La compatibilité doit être

acceptable, car en deçà des limites prescrites, les risques de réactions immunologiques contre le donneur augmentent grandement. L'un des avantages de ce type de greffe est que le greffon ne risque pas d'être contaminé par des cellules tumorales comme c'est le cas pour une greffe autologue. Par contre, le risque de développer une réaction immunitaire, nommée maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) aiguë ou chronique, représente un risque majeur. Cette réaction immunitaire est déclenchée par les cellules immunitaires du donneur qui reconnaissent les cellules du receveur comme du non-soi. Environ 60 % des patients recevant une GCSH vont développer une GVHD [14]. Dans les meilleurs cas la GVHD affecte la qualité de vie du receveur et dans les cas plus sévères, peut causer la mort. Par contre, des procédés visent à éliminer ces cellules alloréactives comme la thérapie photodynamique utilisant le 8-méthoxypsoralen [15] ou le TH9402 [16]. Les patients peuvent aussi recevoir des immunosuppresseurs tels que la cyclosporine et la rapamycine.

2.2 - Greffes autologues

La GCSH autologue est caractérisée par le fait que l'on greffe au patient ses propres cellules. Les CS sont prélevées et congelées avant le traitement myéloablatif afin de pouvoir, une fois le traitement terminé, les ré-infuser au patient. Cette intervention est de plus en plus utilisée afin de traiter diverses maladies comme les lymphomes, les leucémies, les myélomes et plusieurs autres maladies [17]. Annuellement, plus de 800 000 greffes autologues sont effectuées à travers le monde [18]. C'est un avantage majeur pour les patients qui n'ont pas de donneur compatible

et ce type de greffe élimine aussi tout risque de rejet. Cependant, le risque de contamination du greffon par des cellules tumorales est un facteur non négligeable. De nombreuses études visent à éliminer les cellules tumorales du greffon avant la réimplantation. Plusieurs produits comme la cyclophosphamide [19], le mafosfamide [20] sont utilisés afin d'éliminer les cellules tumorales résiduelles. Par contre, en éliminant les cellules potentiellement cancéreuses, une partie des cellules saines du greffon sont aussi éliminées. L'Amifostine, qui est préférentiellement incorporée par les cellules saines [21], et d'autres produits sont donc utilisés afin de préserver les cellules normales du patient [22].

Par contre, bien que la GCSH soit une bonne solution pour repeupler le système hématopoïétique, le patient fait face à une longue période d'aplasie médullaire. Il doit donc avoir recours aux transfusions érythrocytaires et plaquettaires. De plus, la neutropénie sévère rend le patient très vulnérable aux infections. Toute intervention ayant la capacité de réduire la durée de la cytopénie après la chimio/radiothérapie aurait un impact clinique majeur.

3 - Sources de cellules souches

Les CS sont des cellules indifférenciées, c'est-à-dire qu'elles n'ont pas encore atteint le stade de la spécialisation qui les doteront éventuellement d'une identité fixe. Elles ont aussi la capacité de s'autorenouveler et de se conserver pour être encore appelées à se différencier par la suite. Il existe 3 formes de CS : les cellules embryonnaires (embryons, fœtus ou sang de cordon ombilical), les cellules germinales embryonnaires (testicules) et les CS adultes (présentes dans plusieurs organes comme la MO). Ces cellules souches bien qu'elles soient dites multipotentes, ont une capacité de différenciation limitée (Figure 1). Par exemple, les CS de l'ectoderme vont donner naissance aux cellules de la peau tandis que les CS du mésoderme vont produire les cellules sanguines.

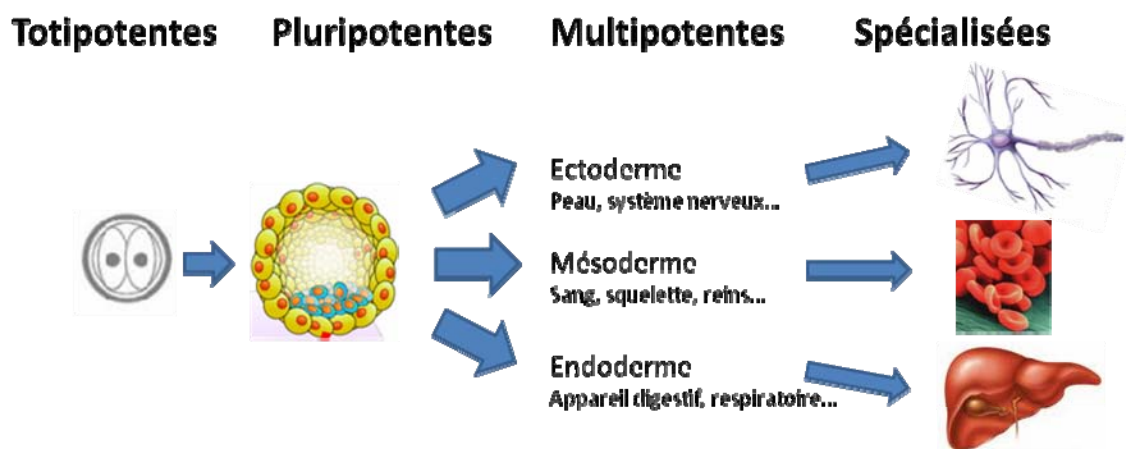


Figure 1: Les cellules souches ont une possibilité de différenciation illimitée et peuvent former toutes les cellules du corps, adapté de [23].

3.1 - Moelle Osseuse

La MO est un tissu situé au centre des os. Les CS de la MO sont dites multipotentes, car elles ont toujours un pouvoir d'autorenouvellement et une capacité de se différencier en différentes composantes sanguines. C'est dans ce tissu que s'effectue la régulation de l'hématopoïèse. La formation de cellules plus spécialisées, comme celles du sang (leucocytes, érythrocytes et plaquettes), est possible grâce aux CSH qui sont à l'origine du renouvellement sanguin. Depuis de nombreuses années, les greffons médullaires sont utilisés pour les allogreffes ainsi que les autogreffes.

3.2 - Cellules souches mobilisées dans le sang

Il a été démontré que les CSH pouvaient aussi se retrouver dans la circulation sanguine. Par contre, elles y sont présentes en très petite quantité. Les CSH, qui comptent pour < 1% des cellules totales de la MO, sont encore plus rares dans le sang. De plus en plus, les CSH du sang sont utilisées pour les GCSH. Des facteurs de croissance tels le « granulocyte colony stimulating factor » (G-CSF), aussi connu sous le nom de Filgrastim, ainsi que le « granulocyte-macrophages stimulating factor » (GM-CSF) ont la capacité d'induire la mobilisation des CSH dans le sang et ainsi augmenter leur nombre de 60 fois [24, 25]. La mobilisation des CSH est régulée par le microenvironnement de la MO via la modulation des interactions entre les CSH et le stroma médullaire [26]. Les CSH sont recueillies par leucophérèse,

procédure consistant à prélever les leucocytes du patient pour ensuite les conserver pour une future GCSH.

4 – Hématopoïèse

L'hématopoïèse est définie par le renouvellement continu et régulé (fabrication et remplacement) des cellules sanguines. Ce système assure un ajustement précis de toutes les cellules hématopoïétiques. Plus de 10^{13} de ces cellules sont produites quotidiennement. Cette production hautement contrôlée est assurée par les CSH pluripotentes capables à la fois d'autorenouvellement et de générer l'ensemble des lignées hématopoïétiques [27, 28]. Le lieu de l'hématopoïèse chez l'humain adulte se situe dans la moelle des os courts et plats (sternum, côtes, vertèbres, os iliaques...) tandis que chez la souris, la rate est aussi considérée comme un site de l'hématopoïèse. L'hématopoïèse peut être divisée en quatre compartiments : les cellules souches pluripotentes, les progéniteurs, les précurseurs et les cellules matures (Figure 2) [29].

4.1 - Cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Les CSH sont capables d'autorenouvellement et, sous l'influence de facteurs de croissance, de s'engager vers une lignée définitive où elles perdront leur capacité de pluripotence. Moins d'une cellule sur 10^5 sont des cellules souches pluripotentes, ce qui fait qu'elles sont difficilement différenciables [30]. Les progéniteurs hématopoïétiques ont été découverts en 1961, lorsque Till et MacCulloch ont

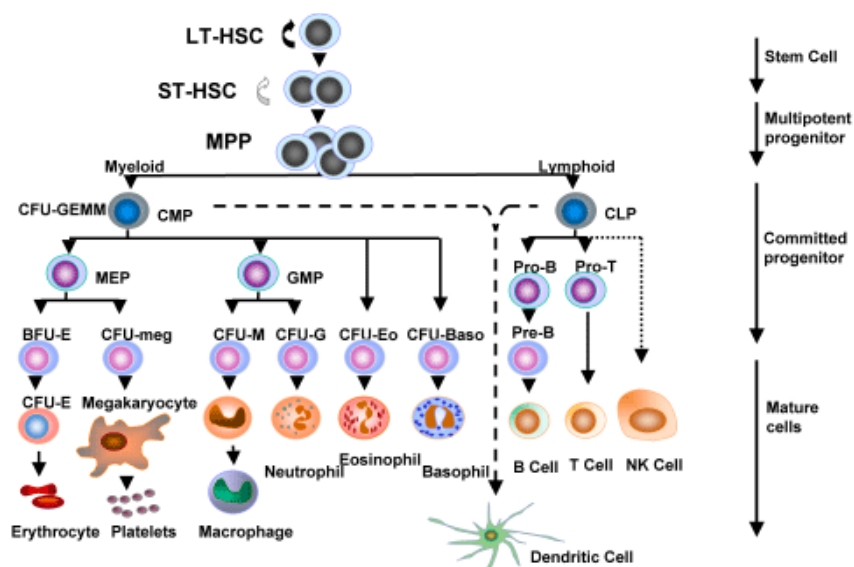


Figure 2 : Représentation du système hématopoïétique. Les cellules souches pluripotentes peuvent être classées en 2 catégories; celles capables de repeupler la moelle osseuse à long terme (LT-HSC) et celles qui ne le peuvent pas (ST-HSC). Les progéniteurs multipotents (MPP) vont donner naissance aux progéniteurs engagés dans une voie de différenciation (myéloïde et lymphoïde) et qui ne pourront plus revenir en arrière. Ces progéniteurs vont s’engager dans une lignée encore plus différenciée (BFU-E, CFU-E, CFU-M...). Les précurseurs hématopoïétiques ont donc perdu toute possibilité d’autorenouvellement et sont proches de la maturation complète (proérythroblaste, myéloblaste, mégacaryoblaste...). Les cellules matures vont passer dans le sang lorsque leur maturation est complétée [31].

pratiqué une greffe syngénique de cellules de moelle osseuse à des souris ayant reçu une dose létale d’irradiation. Au bout du 10^e jour, ils ont pu observer des amas cellulaires macroscopiques formés de colonies contenant plusieurs types cellulaires (colonies mixtes) qu’ils nommèrent plus tard « Colony Forming Unit-Spleen » (CFU-S) [30]. Il a aussi été démontré, chez la souris, qu’une seule CSH pouvait repeupler entièrement le système hématopoïétique, et ce, pour la durée de vie naturelle de l’animal [32].

4.1.1 - Cellules CD34 positives

Les cellules souches ont à leur surface de molécules spécifiques, dit marqueurs phénotypiques, qui permettent leur identification. Les CS présentes dans le sang après la mobilisation sont habituellement retrouvées parmi les cellules démontrant l'expression du marqueur de surface CD34 (CD pour cluster of differentiation), une sialomucine. Cette protéine transmembranaire est exprimée à la surface de 1 à 3 % des cellules de la MO. Hautement conservée chez différentes espèces animales, ce marqueur est vite devenu une caractéristique importante pour l'isolation des cellules souches étant donné la régulation négative que subit l'expression de ce marqueur au cours de la maturation des progéniteurs en cellules plus matures [33]. Malgré tout, sa fonction reste énigmatique même si certains lui ont décrit un rôle potentiel dans l'adhésion cellulaire et le processus de « homing » [34, 35]. L'antigène CD34 est aussi exprimé sur les cellules endothéliales vasculaires et sur certains fibroblastes [36].

Il a été démontré dans divers modèles expérimentaux que les cellules CD34+ avaient la capacité de repeupler la MO suite à leur transplantation. Par contre, plusieurs chercheurs ont soulevé une controverse lorsqu'ils ont publié qu'une population significative de CSH de la moelle était CD34 négatives (CD34-). En effet, des cellules CD34-, lin-, Sca1+, c-kit+ provenant de la MO ont été capables d'assurer la reconstitution à long terme de la MO des souris ayant reçues une dose

létale d'irradiation [32, 37-40]. Ces observations ont soulevé la possibilité qu'un nombre important de CSH pourraient être perdu lors de la sélection CD34+, fréquemment utilisée en clinique. L'expression du CD34 pourrait être le fait de l'état d'activation des CSH et pourrait être réversible [41].

4.2 - Progéniteurs hématopoïétiques

4.2.1 - Progéniteurs, précurseurs et cellules matures

Les progéniteurs, qui proviennent de la première division d'une CS pluripotente, vont s'engager dans une des deux voies de différenciation possible; la voie myéloïde ou lymphoïde. Les précurseurs, morphologiquement identifiables, ont perdu toute possibilité d'autorenouvellement et ne sont plus considérés comme des CS. Ils vont ensuite subir plusieurs phases de différenciation et de prolifération pour devenir des cellules matures. Ils quitteront alors la MO lorsque toutes les étapes de maturation seront complétées. Par exemple, les lymphocytes B et les monocytes ne pourront plus se différencier une fois sortis de la MO [29]. Par contre, les réticulocytes, à l'origine des globules rouges, vont quitter la MO avant la fin de leur maturation pour la compléter dans le sang (Figure 2).

4.2.1.1 – Progéniteurs lymphoïdes

Les progéniteurs lymphoïdes sont à l'origine de deux classes distinctes de progéniteurs : les progéniteurs des lymphocytes T et ceux des lymphocytes B. La maturation de ces progéniteurs amène la formation des cellules du système immunitaire soit les lymphocytes T et B matures. Les progéniteurs lymphoïdes sont aussi à l'origine des cellules « natural killer » impliquées dans la réponse immunitaire innée.

4.2.1.2 – Progéniteurs myéloïdes

Les progéniteurs myéloïdes, aussi appelés CFU-GEMM pour « colony forming unit granulocyte-erythrocyte-macrophage-megakaryocyte » possèdent la capacité de se différencier en progéniteurs encore plus engagés de plusieurs lignées différentes. Une voie possible est la formation de progéniteurs granulocytaires et macrophages (CFU-GM) qui elle-même se différencie pour donner naissance aux progéniteurs granulocytaires (CFU-G) et aux progéniteurs macrophages (CFU-M). La principale fonction des granulocytes est l'immunité innée.

4.2.1.3 – Progéniteurs érythroïdes

Les CFU-GEMM ont aussi la capacité de se différencier en progéniteurs érythroïdes qui formeront les globules rouges ou érythrocytes. Les « burst forming unit-erythroid » (BFU-E) sont les premiers progéniteurs érythroïdes identifiables. Les BFU-E vont se différencier par la suite en CFU-E (« colony forming unit-erythroid ») et plus tard en cellules matures anucléées.

5 – Érythropoïèse

L'érythropoïèse est le processus durant lequel les CSH de la MO vont se différencier en progéniteurs et précurseurs érythroïdes pour finalement terminer leur différenciation en globules rouges matures [42-44]. Les érythrocytes des mammifères sont uniques en leur genre. Contrairement aux globules rouges des oiseaux ou des poissons, ceux des mammifères sont les seules cellules anucléées à circuler dans le sang [45]. Durant l'embryogenèse, la génération initiale des érythrocytes s'effectue dans les îlots sanguins du sac amniotique (érythropoïèse primitive) pour ensuite se déplacer dans le foie fœtal, la rate et éventuellement, dans la MO (érythropoïèse définitive) (Figure 3) [46, 47]. Lors de l'érythropoïèse primitive, les érythrocytes immatures vont se développer de manière semisynchronisée tandis que leur différenciation va s'effectuer de manière désynchronisée lors de l'érythropoïèse définitive [48]. Les érythroblastes immatures d'une souris commenceront à circuler dans le sang au jour E8.25, ce qui coïncide avec le début des contractions cardiaques [49, 50].

5.1 - « Burst Forming Unit-Erythroid » (BFU-E)

Les progéniteurs érythroïdes (PEryth) découlent des CS indifférenciées et pluripotentes de la MO. Après s'être engagés dans une lignée, ces progéniteurs perdent leur capacité à s'autorenouveler et deviennent spécialisés dans une lignée bien précise. Le développement des essais *in vitro* pour l'identification des

progéniteurs hématopoïétiques a grandement facilité l'étude de l'érythropoïèse. Les BFU-E, qui sont les premiers progéniteurs commis exclusivement à la lignée érythroïde, forment des amas de plus de 500 érythroblastes et ont une capacité proliférative importante [46]. Leur prolifération est dépendante de cytokines tels que l'IL-3, le « stem cell factor » (SCF) et le GM-CSF [51, 52]. Leur réponse à l'érythropoïétine (Epo) est très faible puisqu'ils n'ont que très peu de récepteurs à leur surface. Ces progéniteurs sont caractérisés par l'expression des marqueurs de surface CD34, CD33, CD36, CD71 et HLA-DR [53, 54].

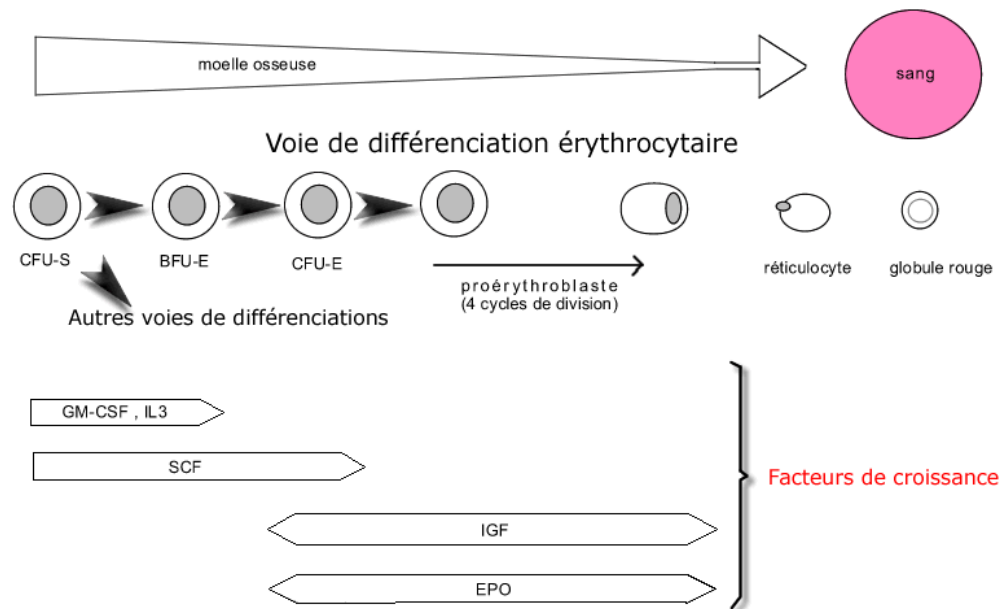


Figure 3 : L'érythropoïèse est le processus durant lequel les progéniteurs multipotents donnent naissance aux progéniteurs plus différenciés de la lignée érythroïde. Ce processus dépend de plusieurs cytokines et est Epo dépendent [55].

5.2 – « Colony forming unit-Erythroid » (CFU-E)

Les CFU-E sont formés suite aux BFU-E et forment les progéniteurs les plus matures capables de générer de petites colonies de 8 à 50 érythroblastes qui ont une capacité proliférative extrêmement réduite [56]. Leur survie est hautement dépendante de l'Epo (1000 à 3000 récepteurs/cellule) [57]. Les CFU-E ne subissent que trois à cinq divisions avant de compléter leur maturation (Figure 3) [56].

Le développement des BFU-E immatures jusqu'aux CFU-E est un processus continu entrecoupé par un état intermédiaire, les BFU-E matures. Les CFU-E vont ensuite donner naissance aux réticulocytes qui vont sortir de la MO pour terminer leur maturation dans le sang.

6- Cytokines importantes

Les cytokines ou facteurs de croissance (FCH) sont d'importants régulateurs de l'homéostasie hématopoïétique, car ils servent à réguler et à induire la prolifération, la différenciation et la survie des CSH [58]. Les cellules stromales (fibroblastes, cellules endothéliales, adipocytes...) peuvent produire la plupart des FCH nécessaires à l'hématopoïèse [59]. L'action de chaque cytokine est spécifique et demande une régulation appropriée. Leurs effets sur les progéniteurs dépendront du stade de maturation de ceux-ci, de la lignée cellulaire ainsi que de l'exposition concurrentielle avec les autres FCH. Par exemple, les CS primitives ont besoin d'IL-1, d'IL-4 et d'IL-6 ainsi que du SCF, qui par une action synergique, vont réguler leur différenciation [30]. L'érythropoïèse est un système hautement contrôlé par les FCH. Une dérégulation du signal peut engendrer plusieurs maladies hématopoïétiques. De nombreuses études ont permis d'identifier jusqu'à maintenant le rôle de plusieurs cytokines importantes pour l'érythropoïèse. Il a été démontré que l'interaction entre le SCF et l'Epo avait un effet positif *in vivo* dans l'érythropoïèse [60, 61]. Nous décrivons ici ces FCH reconnus comme étant les plus importants dans la différenciation et la prolifération des CSH en progéniteurs érythroïdes.

6.1 – « Stem Cell Factor » (SCF)

L'érythropoïèse est régulée par de nombreuses cytokines parmi lesquelles le « stem cell factor » (SCF) et l'Epo jouent un rôle essentiel non redondant [62]. Le

SCF, aussi connu sous le nom de « steel factor » ou « c-kit ligand », est associé au développement des progéniteurs hématopoïétiques précoces, mais aussi des progéniteurs plus matures [63]. Son récepteur, KIT, est exprimé par la majorité des CSH et des progéniteurs ainsi que sur plusieurs tissus non hématopoïétiques [64]. Seul, le SCF n'a que très peu ou pas d'activité stimulatrice sur la MO. Cependant, lorsqu'il est employé en combinaison avec d'autres FCH, il stimule la croissance des progéniteurs myéloïdes et érythroïdes [65-67]. La combinaison du SCF avec les autres FCH permettrait l'entrée des CSH dans le cycle cellulaire [68]. L'injection du SCF comme adjuvant au G-CSF permet un recrutement plus massif des CSH dans le sang. Il a aussi été démontré que le SCF a des effets radioprotecteurs sur la MO de souris irradiées en protégeant les CSH [69-72]. Une anémie sévère et une diminution du nombre de progéniteurs primitifs et érythroïdes ont été observées chez des souris ayant une mutation pour le gène du SCF ou de son récepteur, respectivement [73, 74]. Le SCF et l'Epo ont des rôles séquentiels durant la différenciation érythroïde. En culture, le SCF permet l'augmentation de la production des PEryth en retardant la différenciation des CFU-E, permettant donc leur expansion [75].

6.2 - Érythropoïétine (Epo)

Il y a plus d'un siècle depuis que Carnot et Deflandre affirmaient qu'un facteur humoral, l'hémopoïétine, était à l'origine de la production des globules rouges [76]. Par contre, c'est en 1936 qu'on s'intéressa davantage aux FCH lorsqu'Erling Hjort confirma que des facteurs solubles retrouvés dans le plasma de

lapins pouvaient induire l'érythropoïèse chez des lapins receveurs [77]. Mais ce n'est qu'en 1950 que seront publiés d'importants articles portant sur l'Epo. Kurt Reissmann rapporte dans le journal *Blood* comment des rats parabiotiques, où un des deux partenaires est en mode de carence en oxygène, vont tous les deux développer une hyperplasie de la MO [78].

L'Epo est une glycoprotéine hautement glycosylée de 34 kDa, produite durant la mi-gestation par le foie foetal et plus tard, chez l'adulte, par les cellules peritubulaires (interstitielles ou endothéliales) des reins [46, 79, 80]. Chez l'adulte, 20% de l'Epo serait aussi produite par le foie. L'Epo est essentielle à la maturation des globules rouges. Elle agit en synergie avec plusieurs FCH comme le SCF, le GM-CSF, l'IL-3 et l'« insulin growth factor-1 » (IGF-1) pour provoquer la différenciation et la prolifération des PEryth [81]. Des études ultérieures révèlent que la présence de l'Epo ou de l'EpoR n'est pas nécessaire pour l'engagement des progéniteurs vers la lignée érythroïde ainsi que pour la différenciation des BFU-E en CFU-E [82]. Par contre, l'Epo et son récepteur sont cruciaux *in vivo* pour la prolifération et la survie des CFU-E ainsi que pour leur différenciation terminale [83]. Au-delà du stade des érythroblastes basophiles, le nombre de EpoR diminue et les cellules ne sont plus dépendantes de l'Epo [84]. L'Epo a un domaine d'activité restreint à la différenciation érythroïde (comme la thrombopoïétine pour les plaquettes). La concentration normale d'Epo détectée dans le sang de cordon ombilical après la naissance est de 25 à 50 mU/ml. Chez l'adulte, la concentration sanguine varie habituellement entre 10 et 30 mU/ml, mais peut atteindre jusqu'à 10

U/ml en cas de stress comme une hémorragie sévère [57, 85]. Cette importante hormone est maintenant un traitement reconnu de l'anémie. Par contre, son utilisation requiert de multiples injections sous-cutanées et plus de 30% des patients y sont résistants. De plus, des études révèlent des résultats inquiétants vis-à-vis son utilisation pour les patients souffrant de cancers hématologiques ou ne recevant pas de chimiothérapie [10, 86, 87].

6.3 Autres cytokines importantes

Plusieurs études ont suggéré que le SCF, le GM-CSF et l'IL-3 étaient importants pour la génération et la prolifération des progéniteurs érythroïdes. Par contre, des études effectuées sur des souris portant des mutations nulles pour le GM-CSF [88, 89] ou l'IL-3 [90] ont démontré qu'ils n'étaient pas indispensables et que leurs fonctions pouvaient être compensées par d'autres cytokines. Les souris déficientes pour le SCF ou l'Epo ont, quant à elles, développé des symptômes importants tel une anémie sévère [90, 91] et un arrêt dans la différenciation des PEryth, respectivement [82, 83, 92]. Le SCF et l'Epo sont donc des éléments importants de l'érythropoïèse : le SCF est essentiel pour la prolifération et la différenciation des BFU-E en CFU-E tandis que l'Epo est cruciale pour la survie des CFU-E ainsi que pour la prolifération et la différenciation terminale des érythrocytes (Figure 3).

6.3.1 – Hormones et lipides

Une variété d'autres facteurs comme l'IGF-1 et la dexaméthasone, un glucocorticoïde, ont démontré avoir un effet bénéfique sur l'expansion des PEryth [93]. D'autres hormones, comme l'acide rétinoïque, sont aussi impliquées dans la différenciation des PEryth [94]. Un effet prolifératif sur la lignée érythroïde a également été attribué aux lipides [95, 96].

7 - Signalisation cellulaire

Epo et le SCF jouent différents rôles leur permettant de réguler l'érythropoïèse en assurant la prolifération, la différenciation de même que la survie des progéniteurs érythroïdes. Ces effets sont assurés par des signaux intracellulaires via la liaison du SCF et de l'Epo à leurs récepteurs respectifs.

7.1 - Récepteurs

7.1.1 - Récepteur du SCF

La régulation appropriée de l'érythropoïèse est essentielle tant pour le développement des embryons que pour la production d'érythrocytes matures. Le signal du SCF est très important pour la différenciation des progéniteurs non engagés. Une délétion dans le locus du gène du SCF entraîne chez la souris une réduction de la pigmentation des cellules, la stérilité ainsi qu'une anémie macrocytique sévère [73, 90, 97, 98]. Ces effets témoignent donc de son importance pour le développement normal des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques, des mélanocytes ainsi que des cellules germinales. Deux isoformes distincts du SCF, résultant d'un épissage différent de l'ARN messager, sont présents chez la souris et l'homme. Une glycoprotéine de 248 acides aminés (a.a) est rapidement clivée de la cellule productrice pour former une protéine soluble active de 164 a.a. tandis qu'une autre forme, dépourvue de site protéolytique, va produire une glycoprotéine

membranaire de 220 a.a [62]. Le rôle physiologique de ces deux isoformes dans le développement des cellules sanguines n'est pas entièrement compris. Des études *in vivo* démontrent que le SCF membranaire serait important pour le développement des cellules du sang [62].

L'importance du SCF dans l'expansion et la survie des Peryth a intéressé de nombreux chercheurs ce qui a permis d'identifier d'importants signaux de transduction activés par le SCF. Le récepteur du SCF, KIT, est un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK). Les RTK ont la capacité d'activer, suivant la liaison de leur ligand, une variété de signaux intracellulaires possédant eux-mêmes une activité kinase intrinsèque. L'association du SCF et de KIT va entraîner l'homodimérisation de celui-ci et l'autophosphorylation de plusieurs résidus tyrosines kinases du récepteur. Ces sites vont devenir des cibles pour une variété de protéines adaptatrices comme le Src, la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), la protéine Ras ainsi que la phospholipase C (PLC) (Figure 4).

Bien que le SCF ait un effet important sur de multiples lignées hématopoïétiques, le rôle de chaque signal cellulaire dans la régulation des CSH n'a été caractérisé préférentiellement que dans la lignée myéloïde. PI3K et Src sont associés principalement à la croissance et la survie des progéniteurs [99]. Le PI3K est aussi associé à l'activité de la protéine Akt, ayant une activité anti-apoptotique via Bcl-2. Selon des études de Hong et al, la présence seule de Src serait suffisante pour activer la cascade de signalisation de PI3K/Akt en réponse au SCF [100]. Par

contre, Src et PI3K ne seraient pas indispensables à la lignée érythroïde puisque sa mutation n'entraîne aucun effet sur cette lignée contrairement aux autres lignées myéloïdes [101]. L'activation de KIT est aussi à l'origine de l'activation des facteurs de transcription STAT (« signal transducers and activators of transcription ») qui vont se dimériser et transloquer au noyau pour activer plusieurs facteurs de transcription importants pour la prolifération et la survie des progéniteurs [102]. L'activation de la cascade de signalisation des MAPK (« mitogen-activated protein kinase») est aussi très importante pour l'induction de la prolifération et de la différenciation chez les Peryth. Ce sujet sera donc abordé ultérieurement.

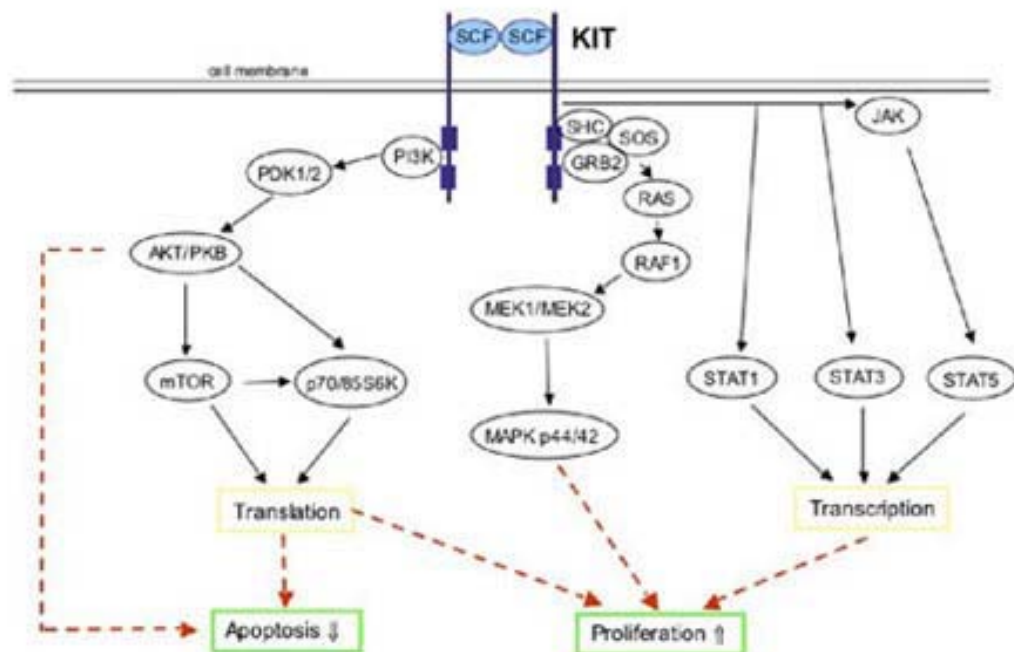


Figure 4 : Cascade de signalisation induite par le SCF lorsqu'il se lie à son récepteur Kit. Plusieurs voies de signalisation sont importantes pour la prolifération et la survie des progéniteurs érythroïdes comme la voie de PI3K/Akt et la voie des MAPK [103].

7.1.2 - Récepteur de l'Epo (EpoR)

L'Epo est composée de 165 a.a et presque autant d'hydrates de carbone. Sa séquence peptidique s'est hautement conservée durant l'évolution. L'Epo se lie à la surface des récepteurs des PEryth pour réguler la prolifération, la différenciation et la survie des cellules érythroïdes de la MO. Elle a été clonée pour la première fois en 1985 [104, 105] et est maintenant utilisée cliniquement pour traiter l'anémie associée à l'insuffisance rénale, au traitement à la zidovudine, aux maladies non hématologiques traitées par chimiothérapie ou tout simplement associée à la chirurgie [81]. L'EpoR n'est pas exclusivement retrouvé sur des cellules érythroïdes. Il a été rapporté sur des mégakaryocytes [106], des cellules du placenta [107], des lymphocytes B [108], sur les cellules endothéliales [109] et sur certains neurones [110, 111]. Ceci suggère que l'Epo aurait un rôle physiologique additionnel pour certains types cellulaires non érythroïdes. Les souris « knock-out » (KO) pour l'Epo ou son récepteur meurent au jour embryonnaire 13,5 suite à une anémie fœtale sévère [82].

La liaison de l'EPO à son récepteur cause l'homodimérisation et le changement de conformation de ce récepteur. L'EpoR, contrairement à celui du SCF, est dépourvu d'activité tyrosine kinase. C'est donc la protéine JAK2, une protéine kinase de la famille des Janus, déjà présente sur le domaine cytoplasmique du récepteur, qui s'activera par autophosphorylation et provoquera l'activation des autres résidus tyrosines kinase comme STAT5, PI3K et MAKP (Figure 5). Comme nous l'avons décrit plus haut, l'Epo agit essentiellement sur la survie et la

prolifération des PEryth. Son action principale est l'activation de signal aidant la cellule à survivre comme l'activation de la voie Akt et STAT5 qui vont activer d'autres protéines anti-apoptotiques.

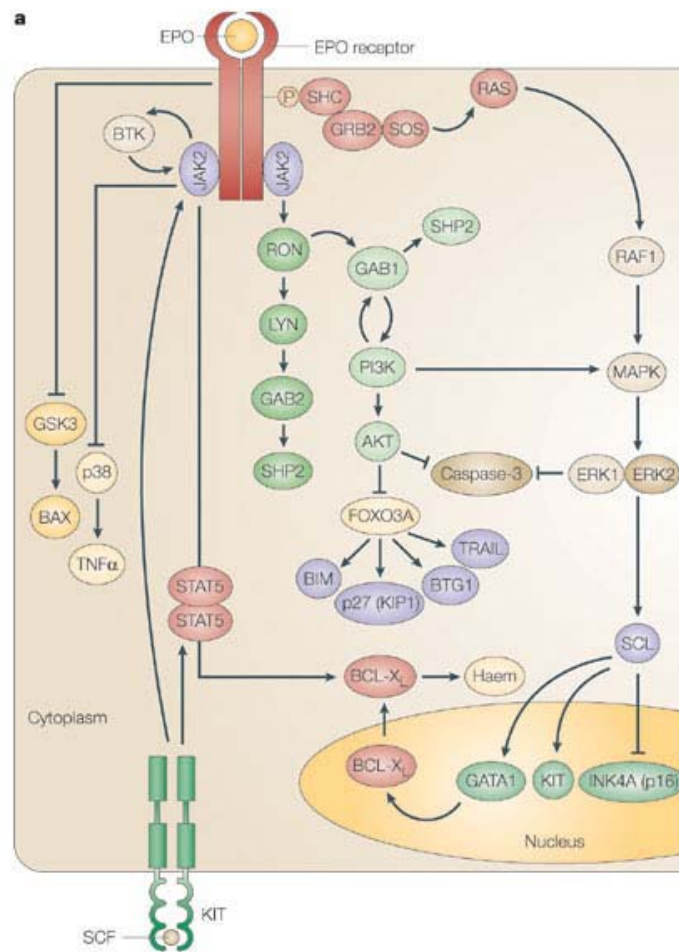


Figure 5 : Voie de signalisation de l'Epo. Récepteur à activité tyrosine kinase induite par JAK2 qui va s'autophosphoryler et activer d'autres tyrosines kinases comme STAT5, PI3K/Akt et MAPK. Ces voies de signalisation vont envoyer un message de survie à la cellule. [112]

7.2 Coopération entre le SCF et l'Epo

Des études ont démontré que des mutations de KIT avaient pour conséquence la diminution du nombre de CFU-E dans le foie fœtal de souris KO [90]. Par contre, comme les CFU-E dépendent de l'Epo pour leur survie et leur prolifération, ces études suggèrent donc que les CFU-E ne peuvent pas arriver à maturité sans une cascade de signalisation de l'Epo et du SCF fonctionnelle. Bien qu'il ait été démontré que le SCF était capable d'induire la prolifération et la survie des PEryth, son effet est grandement amplifié par la présence de l'Epo. Il existerait donc une coopération entre ces deux récepteurs lors de l'érythropoïèse.

KIT et EpoR sont localisés à l'intérieur du même complexe membranaire de la cellule et la liaison de leurs ligands permet l'activation de cascades de signalisation communes. Il est donc normal qu'il y ait interaction entre les deux suite à leur activation. Il a été démontré que l'activation du récepteur KIT pouvait induire une activation partielle de l'EpoR sans la présence de l'Epo [52]. Par contre, sans l'Epo, le SCF est incapable de transmettre des signaux complets et supporter la croissance des PEryth [113]. L'Epo est cruciale *in vivo* pour la prolifération et la survie des CFU-E et la différenciation complète des érythroïdes. Par contre, elle n'est pas requise pour la génération des BFU-E et pour leur différenciation en CFU-E [82, 83, 92]. Des études effectuées *in vitro* ont démontré que dans des conditions de privation, la combinaison du SCF et de l'Epo pouvait induire un effet synergique sur la prolifération des PEryth [43, 52]. Sui et al ont démontré que leur action permettait

d'activer de manière synergique la voie de MAPK, plus précisément ERK1/2 (« extracellular signal-regulated kinase ») [113]. D'autres ont démontré comment le SCF permet de maintenir l'activation d'EpoR et l'expression de la protéine STAT5 amenant à l'expression de Bcl-XL, une molécule anti-apoptotique et ainsi permettre la survie des PEryth (Figure 6). Ensemble, ces études ont donc permis de faire un lien entre la signalisation de l'Epo et du SCF dans la régulation des PEryth.

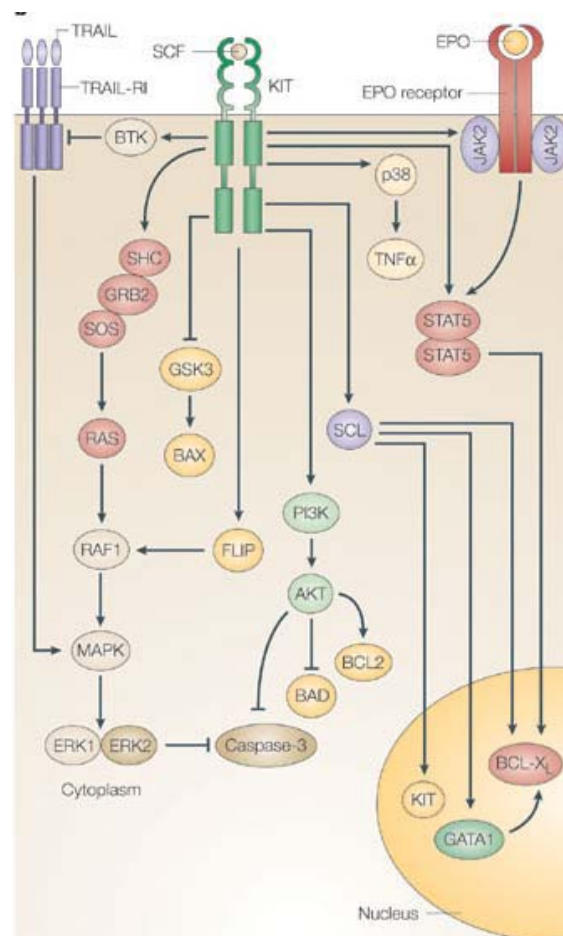


Figure 6 : Coopération entre les voies de signalisation induites par l'Epo et le SCF [112].

7.4 Voie de signalisation des MAPK

La cascade de signalisation classique des MAPK est activée en réponse à un grand nombre de stimuli extracellulaires comme le SCF et l'Epo et joue un rôle central pour la prolifération, la différenciation et la survie des PÉryth [114, 115]. La cascade de signalisation des MAPK est composée de trois voies de signalisation : p38, JNK et celle qui nous intéresse ici, ERK1/2. Contrairement à ERK1/2, p38 et JNK sont activées principalement par des stress environnementaux comme les ultraviolets, les chocs osmotiques ou les cytokines inflammatoires [116-119]. La voie des MAPK réfère principalement à la voie de signalisation traditionnelle des MAPK kinase kinase ou MAPKKK aussi appelé la voie de Raf (Figure 7). Pour être actives, les MAPK doivent absolument être phosphorylées sur leurs résidus thréonines et tyrosines [120]. L'activation de Raf entraîne l'activation subséquente de la MAPKK, MEK1/2. MEK1/2 va ensuite directement activer ERK1/2 aussi appelé protéine p44/p42 relativement à son poids moléculaire. Plusieurs facteurs de transcription dans le noyau comme Erg-1 ou GATA-1, essentiels pour la prolifération et la différenciation de la lignée érythroïde, seront par la suite activés par ERK1/2 [121, 122].

La voie des MAPK est cependant plus compliquée qu'un simple schéma linéaire, car ERK1/2 peut être activé via plusieurs mécanismes indépendants. La réponse proliférative d'ERK1/2 dépend de l'intensité et de la durée de l'activation de celui-ci et il ne semble pas exister de règle générale qui détermine son niveau

d'activation suite à la stimulation d'une cytokine [120, 123]. Ce processus est indépendant de Ras et peut être induit par de nombreux facteurs comme la PI3K, la PLC ainsi que les protéines kinases C (PKC) [85, 124, 125]. Les glucocorticoïdes et les lipides ont aussi été démontrés comme étant capables de stimuler l'activation d'ERK1/2 [126-128]. La voie classique des MAPK n'est donc pas cruciale pour son activation. De plus, ERK1/2 semble jouer un rôle distinct dans la différenciation ou la prolifération cellulaire dépendamment de la lignée cellulaire et de son stimulus. L'expression d'ERK1/2 jouerait aussi rôle important pour la prolifération des PEryth et exercerait un effet négatif sur leur différenciation [129, 130]. Les lipides pourraient donc jouer un rôle important et constituer une avenue intéressante pour la prolifération des progéniteurs érythroïdes, un fait important pour ce projet de recherche.



Figure 7: Voie conventionnelle des MAPK. La MAPKKK : Raf, la MAPKK : MEK1/2 et finalement la MAPK : ERK1/2 vont permettre l'activation de facteurs de transcription qui va permettre la prolifération, la différenciation et la survie des PEryth.

7.4.1 Phosphatases spécifiques aux MAPK (MKP)

La régulation de la déphosphorylation des MAPK joue un rôle déterminant quant à la durée et à la force du signal et en déterminera ainsi l'effet biologique. Les facteurs qui influencent la régulation spatiotemporelle du signal des MAPK sont divers et complexes. Ils incluent la densité et la vitesse de l'internalisation du récepteur, l'association des protéines adaptatrices avec ce récepteur ainsi que la balance entre l'activité kinase et la régulation négative contrôlée par des protéines comme les phosphatases [131-133]. Chez les mammifères, ce contrôle est effectué par l'expression et l'activité de plusieurs molécules dont celles d'une famille de 10 protéines ayant une activité spécifique pour les MAPK, les « dual-specificity (Thr/Tyr) MAPK phosphatases » ou MKP, qui vont déphosphoryler et inactiver les isoformes des MAPK [134]. Certains MKP codent pour des gènes qui sont régulés positivement au niveau de la transcription par des stimuli reconnus pour activer les MAPK. De plus, certaines MKP sont capables de cibler préférentiellement certaines isoformes des MAPK. C'est le cas de la MKP-1, ou CL100/DUSP1. C'est une enzyme nucléaire capable de reconnaître ERK1/2 et le désactiver [134-136]. Elle est le transcrit des « immediate-early genes (IEG) » et est rapidement produite lors de l'activation de ERK1/2. MKP-1 est aussi connue pour être capable de réguler p38 et JNK [134]. MKP-1 est rapidement dégradé suite à son activation par ubiquitination via les protéasomes [137].

8- PBI-1402

Le PBI-1402 est un lipide synthétique de petit poids moléculaire utilisé couramment dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique. Il a été démontré par Prometic BioScience Inc. que le PBI-1402 est capable d'induire l'activation des neutrophiles, *in vitro* et *in vivo*, et ce, à un niveau comparable au GM-CSF (données de Prometic BioSciences). *In vitro*, le PBI-1402 permet de prolonger la survie des neutrophiles et amplifier leur capacité de phagocytose. Il a aussi un effet protecteur lors d'un traitement à la doxorubicine, qui entraîne habituellement l'apoptose des neutrophiles. Il a aussi été démontré, suite à des études sur des myélomes et des carcinomes, que le PBI-1402 pourrait avoir un léger effet anticancéreux probablement relié à son habileté à induire l'activation des neutrophiles.

8.1 - Récentes découvertes

Récemment, il a été démontré que le PBI-1402 pouvait stimuler la prolifération et la maturation des progéniteurs hématopoïétiques avec une activité comparable à celle du GM-CSF et l'Epo (résultats non publiés). De plus, Prometic Biosciences a démontré que lorsqu'il est utilisé en combinaison avec le GM-CSF et l'Epo, un effet additif sur la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques est observé [138]. Des études effectuées *in vivo* indiquent que le PBI-1402 aurait un effet myéloprolifératif dans la MO de souris immunosupprimées par des agents

cytotoxiques. Ces études préliminaires ont aussi suggéré que le PBI-1402 pourrait jouer un rôle dans l'expansion des progéniteurs érythroïdes.

8.2 - Applications cliniques

L'importance de ces observations sur les progéniteurs hématopoïétiques démontre que le PBI-1402 pourrait être avoir un effet bénéfique tant sur le plan de la défense immunitaire et qu'au maintien de l'homéostasie hématopoïétique. De plus, ce lipide permettrait l'activation des voies de signalisation importantes pour la prolifération érythroïde.

Le PBI-1402 a l'avantage d'être administré par voie orale contrairement à ses compétiteurs, dont l'Epo qui doit être administrée plusieurs fois par semaine de manière sous-cutanée. De plus, il a été démontré que le PBI-1402 avait peu ou pas d'effet toxique et pouvait être toléré jusqu'à des doses aussi élevées que 1 g/kg (données internes de l'étude clinique de Phase I de Prometic BioSciences).

Des études cliniques sont présentement en cours afin de déterminer l'efficacité du PBI-1402 dans le traitement de l'anémie induite par la chimiothérapie ou causé par l'insuffisance rénale.

9- Description du projet de maîtrise

Ce projet de maîtrise visait à évaluer le pouvoir du PBI-1402 à promouvoir l'expansion des progéniteurs érythroïdes et en déterminer son mécanisme d'action. Nous avons aussi évalué l'effet de cette expansion sur la cytopénie post-greffe induite chez des souris irradiées. Nous avons donc utilisé un système de culture *in vitro* afin de générer de grandes quantités de progéniteurs érythroïdes. Nous avons pu évaluer la capacité du PBI-1402 à induire différents signaux de signalisation intracellulaires impliqués dans l'expansion des progéniteurs érythroïdes. Ces études ont été réalisées dans le but de déterminer le mécanisme d'action du PBI-1402 impliqué dans l'expansion des progéniteurs érythroïdes afin d'améliorer les traitements de l'anémie induite par la chimiothérapie ou par l'insuffisance rénale.

9.1 - Procédure expérimentale

Ce projet demandait la mise au point de condition de cultures optimales pour la culture de cellules de sang mobilisé, provenant de donneurs consentants, pour la production d'une grande quantité de PEryth.

9.1.1 - Différenciation des CD34+ en progéniteurs érythroïdes

La mise au point de conditions de culture liquide optimales pour l'expansion des PEryth constituait l'étape la plus importante du projet. Les cellules de donneurs sains ont été sélectionnées pour obtenir les cellules CD34+. Ces cellules ont été mises en culture pour 8 ou 9 jours afin de les laisser se différencier en PEryth.

9.1.2 - Évaluation du mécanisme d'action du PBI-1402

Une fois les progéniteurs érythroïdes obtenus par différenciation des cellules CD34+, nous avons pu déterminer le mécanisme d'action du PBI-1402 en utilisant diverses combinaisons de cytokines (SCF et Epo) et en évaluant le niveau d'activité des voies de signalisation impliquées dans la lignée érythroïde.

9.1.3 - Évaluation des progéniteurs érythroïdes humains et murins

L'évaluation des PEryth humains et murins a été effectuée à l'aide de milieux semi-solides faits à base de méthyl-cellulose disponible commercialement (StemCell Technologies) et favorisant la croissance des colonies érythrocytaires identifiables qui ont pu être dénombrées à l'aide d'un microscope inversé.

9.1.4 - Évaluation de la réponse au PBI-1402 dans un modèle murin

Des souris C57BL/6J ont reçu une dose létale d'irradiation afin d'induire une aplasie de la MO. Elles ont ensuite reçu, le jour même, une greffe de cellules de MO syngénique afin de reconstituer leur MO. Les souris ont reçu chaque jour une dose orale de PBI-1402. La reprise hématologique a été évaluée chaque jour post-greffe à l'aide de décomptes et de frottis sanguins. De plus, l'expansion érythrocytaire a été évaluée à l'aide des cultures semi-solides.

Cette série d'expériences a permis d'évaluer le rôle du PBI-1402 dans l'expansion des progéniteurs érythroïdes *in vitro* et *in vivo* et de déterminer le mécanisme d'action impliqué.

9.2 – Objectifs principaux du projet

Au cours de ce projet, nous avons tenté de rencontrer les objectifs suivants :

- Déterminer l'effet du PBI-1402 sur des CSH
- Déterminer le mécanisme d'action du PBI-1402 impliqué dans l'expansion des progéniteurs érythroïdes humains
- Déterminer si le PBI-1402 permet de réduire la durée de l'anémie induite par un traitement myéloablatif tel que l'irradiation.

ARTICLE

Les résultats présentés dans l'article sont le fruit de mon travail. Marie-Josée Morin a aussi contribué de façon notable pour l'évaluation *in vivo*.

PBI-1402 enhances expansion of human erythroid progenitors via the Erk1/2 pathway and reduces erythropenia in myeloablated mice post transplantation

Sabrina Vinet^{1,2}, Marie-Josée Morin¹, Gorazd Kros¹ and Denis Claude Roy¹

¹Hematology-Oncology, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, Montreal, Quebec, Canada

²Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Canada

Supported by ProMetic BioSciences Inc, Laval, Quebec, Canada.

Corresponding Author:

Denis Claude Roy, MD

Div. Hematology-Oncology

Hopital Maisonneuve-Rosemont

5415 l'Assomption blvd.

Montreal, Quebec, H1T 2M4

Canada

Telephone : 514-252-3400 ext 3331

Fax : 514-252-3430

Email : denis-claude.roy@umontreal.ca

Subject : Erythropoiesis

Key words: PBI-1402, erythroid progenitors, erythroid reconstitution, erythropenia, BFU-E, CFU-E, Epo, SCF, ERK1/2, MKP-1

Abstract

One of the most important complications of intensive radiotherapy or chemotherapy is cytopenia, which can persist for significant amount of time even after stem cell transplantation. PBI-1402, a small lipid, was previously shown to be associated with decreased neutrophil apoptosis caused by cytotoxic agents. Our work has shown that 5-9 day primary human hematopoietic cell *in vitro* culture in the presence of PBI-1402 resulted in an increased number of erythroid progenitors (CFU-E)($p<0,05$). Dose-response experiments evaluating sensitivity to erythropoietin (Epo) of cells exposed to PBI-1402 indicated that PBI-1402 did not have a sensitizing effect and that both treated and control cells respond similarly to Epo. In addition, PBI-1402, used in combination with stem cell factor (SCF) and Epo, enhanced and prolonged ERK1/2 phosphorylation ($p<0.05$), a signalling pathway important for erythroid progenitor cell proliferation. This effect was associated with a decrease of the phosphatase MKP-1 activation in PBI-1402 exposed cells. This translated into and increased proliferation of erythroid progenitors as well as a reduced duration and level of anemia in an *in vivo* murine transplantation model. Lethally irradiated mice that received syngeneic stem cell transplantation were treated orally with PBI-1402 for 14 days. These mice demonstrated a significant reduction in post-transplantation anemia in a dose dependent manner compared to control (vehicle)($p<0.05$). Moreover, PBI-1402-treated mice harboured significantly higher numbers of BFU-E and CFU-E in bone marrow compared to control ($p<0.05$). These results demonstrate that PBI-1402 treatment significantly reduced transplantation-induced anemia with concomitant acceleration in erythroid recovery.

Abbreviations used in this article : BFU-E : burst forming-unit colony, BM : bone marrow, CFU-E : colony forming-unit erythroid, EPC : erythroid progenitor cells, Epo : erythropoietin, EpoR : Epo receptor, ERK1/2 : extracellular regulated kinase, KIT : SCF receptor, PBMC : peripheral blood mononuclear cells, MC : methylcellulose media, MKP-1 : MAPK phosphatase, SCF : stem cell factor, RBC : red blood cells.

Introduction

The most frequent and important side effect of chemotherapy and/or radiotherapy is cytopenia. While neutropenia and thrombocytopenia are usually transient, anemia is usually sustained and protracted. The incidence of anemia in patients treated by myelosuppressive chemotherapy, radiation therapy, or both, is between 70% and 90% [1]. In addition, an association between uncorrected anemia before or during cancer therapy and a poorer prognosis has been reported in a number of studies [2-6]. Blood transfusions or erythropoiesis-stimulating agents like erythropoietin are often needed to restore blood cell counts. Inferior quality of life, increased risk for infections and auto-immune reactions (alloimmunization), as well as high treatment costs, are all consequences of such treatments [1, 7-10]. New therapeutic agents that would enhance erythropoiesis and promote acceleration of hematopoietic reconstitution are now being developed in order to offer safer and lower cost alternatives [11-13].

Erythropoiesis is regulated by a number of growth factors and cytokines, among which stem cell factor (SCF) and erythropoietin (Epo) play an essential role [14-18]. The earliest progenitor cell committed exclusively to erythroid lineage, the burst-forming unit-erythroid (BFU-E) will, in the presence of SCF, differentiate into colony-forming unit-erythroid (CFU-E) [19-23], which will subsequently in the presence of Epo, give rise to mature erythrocytes. While SCF is crucial for effective early erythroid progenitor (BFU-E) development, Epo is essential for the proliferation, survival, and differentiation of CFU-E progenitors [21, 24-27]. Whereas Epo alone is able to stimulate human erythroid cell development and

maturation from CD34⁺ progenitor cells, a markedly enhanced, synergistic proliferation and expansion of developing erythroid cells is achieved by the combination of Epo and SCF [14, 27-30].

Binding of SCF and/or Epo to their receptors lead to activation of multiple signal transduction pathways, specifically the Janus kinase and Signal Transducers and Activators of Transcription (Jak/Stat), the Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase (MAPK/ERK) and the Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) pathways [30-33]. Activation of the ERK pathway by both SCF and Epo plays a distinct role in cell proliferation and differentiation, depending on the cell lineage and extracellular stimuli [34, 35]. In erythropoiesis, involvement of the ERK transduction pathway is differentially involved in the proliferation and/or differentiation of early BFU-E and late CFU-E erythroid progenitor cells [36, 37]. Glucocorticoids and lipids have also been shown to increased ERK1/2 phosphorylation and play important role in erythroid progenitor cells proliferation [38, 39]. In addition, MAPK must be turned off after their activation to achieve appropriate cellular responses [40]. MAPK are negatively regulated by a family of dual-specificity tyrosine phosphatases, the MAPK phosphatases (MKPs). In particular, 10 MKPs act to dephosphorylate and inactivate different MAPK isoforms in mammalian cells [40, 41]. For example, MKP-1 (mouse homologue of human DUSP1 or CL100) and its homologues are rapidly induced by growth factors or stress signals [42, 43].

Finding new treatment that could induce proliferation of erythroid progenitors by acting on intracellular pathway, such as the MAPK pathway, and reduced or

eliminate the need of blood transfusion is crucial. PBI-1402 is a small lipid which has been shown to enhance neutrophil survival and activation [12]. Since it can be administrated orally, it represents a considerable advantage compared to current treatments for future application. In this study, we demonstrated that PBI-1402 can enhance erythroid progenitor cells (EPC) proliferation, via prolonged activation of ERK1/2 signalling pathway. This effect is most likely responsible for the reduced erythropenia and the faster erythroid recovery observed in myeloablated mice. Therefore, PBI-1402 represents an interesting new candidate that could potentially be used as an alternative treatment for anemia patients.

Materials and Methods

Clonogenic assay for human and mouse BFU-E and CFU-E

The number of human and mouse BFU-E and CFU-E-derived colonies were determined using methylcellulose medium (MC) (Methocult, StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada). Human BFU-E and CFU-E were plated in human MC media (cat no H4434, H4330 or H4230) and quantified after 14 days of incubation. For *in vivo* experiment, mouse BFU-E and CFU-E were plated in mouse MC media (cat no M3334 and M3234, respectively) and were quantified after 7 and 2 days using an inverted microscope, respectively.

Human cell culture

Hematopoietic progenitors were obtained from healthy volunteers after obtaining signed informed consent in accordance with Hopital Maisonneuve-Rosemont Ethics Committee regulations. Peripheral blood progenitors were collected following granulocyte colony-forming factor (G-CSF) mobilization. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation (Ficoll-Hypaque, Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfee, Montreal, Canada). Human PBMCs were cultured for 5 days in long term culture medium (Myelocult, cat no H5100, StemCell Technologies) in the presence or absence of 0.5mM of PBI-0049, (PBI-0049 is pro-drug, in liquid state at 37°C, used for cell culture and yielding PBI-1402).

Antibodies for flow cytometry

Monoclonal antibodies directed at human epitopes: PE-conjugated CD34 (clone 563), FITC-conjugated transferrin receptor CD71 (clone M-A712), APC-conjugated CD36 (clone CB38 (NL07)) and PE-Cy5-conjugated glycophorin A CD235a (clone GA-R2 (HIR2)) were all purchased from BD Pharmingen (Mississauga, ON, Canada).

Primary hematopoietic cell culture and erythroid differentiation

Enrichment for CD34⁺ cells from apheresis cells was performed using positive selection with anti-CD34-tagged magnetic beads (EasySep, StemCell Technologies) following the manufacturers' protocol. Purity, as determined by flow cytometry, was always more than 95%. CD34⁺ cells were differentiated into erythroid progenitors by culturing them in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, cat no 11995, Gibco, Burlington, ON, Canada) supplemented with 100 ng/ml recombinant human stem cell factor (SCF, Stemgen, Amgen, ON, Canada), 1 U/ml recombinant human erythropoietin (Epo, Eprex, Janssen-Ortho Inc, ON, Canada), 40 ng/ml insulin-like growth factor (IGF-1), 10⁻⁶ mol/L dexamethasone, 10⁻⁶ mol/L β -estradiol and 0.128 mg/ml iron-saturated human transferrin, all from Sigma (St-Louis, MO, USA) [20, 28]. Cells were incubated at 37°C, in humidified atmosphere of 5% CO₂ for 9 days. For some experiment, CD34⁺ cells were also cultured in presence of 0.2 mM of PBI-1402 (dissolved in DMEM). Erythroid progenitors were enumerated using Wright-Giemsa stained cytospin and flow cytometric expression of CD34, CD71, CD36 and CD235.

Cell treatment and immunoblotting

Erythroid progenitors obtained from day 8 primary hematopoietic cell culture were cytokine starved for 4 hours and then exposed to various combinations of Epo, SCF and 0.2 mM of PBI-1402, or left untreated for 5, 10, 30, 60 or 120 minutes. In some experiments, erythroid progenitors were pre-treated, during the last 2h of cytokine starvation, with 10 μ M of U0126, a MEK1/2 inhibitor (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Cells were then washed with ice-cold phosphate-buffered saline, lysed for 30min in a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA supplemented with freshly prepared protease inhibitor cocktail (cat no. 11 836 170 001, Roche Diagnostics, Laval, Qc, Canada) and “halt phosphatase” inhibitor cocktail (cat no 78420, Pierce, Rockford, IL, USA). Soluble protein concentration was determined using BCA protein assay (Pierce) according to manufacturer’s protocol. SDS-PAGE and immunoblotting were performed according to Bio-Rad’s (Hercules, CA, USA) protocol, on 4% (stacking) and 10% (resolving) tris-glycine gels. Proteins were transferred on PDVF-membrane (Bio-Rad). The primary antibodies against phospho-p44/42 kinase (Thr202/Tyr204) (cat no 9106), phospho-MKP1 (Ser359) (cat no 2857), total p44/42 (cat no 9102) and pan-actin (cat no 4968) were all purchased from Cell Signaling Technology. Antigen-antibody complexes were visualised by incubation with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (cat no 7074) or goat anti-mouse IgG secondary antibodies (cat no 7076). Proteins of interest were visualized using Western Lightning Chemiluminescence reagent plus (PerkinElmer, Boston, MA, USA) and visualised by autoradiography.

***In Vivo* Experiments**

Male C57BL/6J mice (6-7 weeks) were obtained from Jackson Laboratories and housed in HMR research centre animal facility according to animal safety committee requirements. Mice were irradiated sublethally (850 Rad) and then received 0.5×10^6 BM cells from syngeneic mice. PBI-1402 treatment (100 or 200 mg/kg of body weight, PBI-1402 is dissolved in PBS) was performed by intragastric gavage daily for 16 days starting the day following transplantation. Control mice were fed an equal volume of phosphate-buffered saline solution (PBS). Blood samples from the saphenous vein and bone marrow (BM) cells were taken at day 4, 7, 10, 13 and 16. Red blood cell count and hemoglobin level were measured using an electronic cell counter (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada).

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM for each treatment compared to control. For each independent experiment treatment, values were expressed as a percentage of control and statistical analysis was then carried out on the data from different experiments. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test when comparing two groups ($P < 0.05$ was taken as significant) or non-linear fit analysis for dose-response curves, using PRISM version 4.03 for Windows (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Results

PBI-1402 increases the number of EPC in G-CSF stimulated- peripheral blood mononuclear cells culture (G-PBMC).

In order to investigate the effect of the PBI-1402 on hematopoietic progenitors, G-PBMC were exposed to the pro-drug (PBI-0049) for 5 days and then evaluated for multipotent (CFU-GEMM), erythroid (BFU-E and CFU-E) and myeloid progenitors (CFU-GM). While the number of BFU-E progenitors slightly decreased in cultures devoid of PBI-1402 (Fig. 1A; white bars), its presence resulted in their maintenance during the 5-day incubation. PBI-0049 also significantly increased the number of CFU-E compared to both, input and control culture values (Fig. 1B). No significant effect of PBI-0049 on CFU-GM or primitive progenitors (CFU-GEMM) was observed during 5 day culture (Fig. 1C, D). These results indicate that PBI-0049 is not only able to preserve EPCs but it can also increase the expansion of the more mature EPCs *in vitro*.

In vitro growth and differentiation of erythroid progenitors from CD34+ peripheral mobilized blood cells.

To better isolate the impact of PBI-1402 on erythroid progenitors, we have employed an erythroid differentiation culture system described in Materials and Methods (Fig. 2A). Morphological examination at day 8 of the culture using Wright Giemsa staining showed large and relatively uniform cells with bright blue cytoplasm, pale perinuclear zones and clumped nuclear chromatin consistent with erythroid progenitor cells morphology (Fig 2B; photomicrograph) [44]. Flow cytometry analysis further showed that most cells (greater than 90%) present at day 8

expressed CD34, CD36, CD71 and mild expression of glycophorin A (CD235a) [45-47] (Fig. 2B; flow cytometry histograms). The CD235a expressing subpopulation was associated with further erythroid differentiation and correlated with decreased CD71 and CD36 expression (data not shown). These results showed that these culture conditions almost exclusively favored erythroid differentiation and were therefore used for all subsequent experiments.

Exposure of EPCs to PBI-1402 increases the number of CFU-Es generated from CD34+ cells via a mechanism independent of stem cell factor or erythropoietin.

The culture conditions described above were then used to study the effect and mechanism of action of PBI-1402 on erythroid progenitors during their expansion and differentiation. PBI-1402 at 0.2 mM did not have a notable effect on total cell expansion during up to 9 days of incubation. Semi-solid assay for BFU-E revealed that their frequency was also not affected by the presence of PBI-1402 (Fig 3B). In contrast, PBI-1402 significantly increased the frequency of CFU-Es from day 7 to the end of observation period compared to control (Fig. 3C). Since the development of CFU-E depends on the presence of Epo, we next investigated if the increase in CFU-E frequency was due to a PBI-1402 mediated indirect increase in cell sensitivity to Epo or SCF. For this purpose, CD34+ cells were cultured for 6 days in the same primary hematopoietic cell media (with all growth factors) containing or not 0.2 mM of PBI-1402 and on day 6, the cells were exposed to graded increases in Epo or SCF concentration in MC media. Dose-response curves to Epo showed a significant increase in CFU-E ($p < 0.05$) at all Epo concentrations evaluated. However, no shift in the sensitivity to Epo for cells cultured with PBI-1402

compared to control group was detected (Fig. 3D). Similar experiments performed with graded concentrations of SCF (0 to 75 ng/ml) showed no effect of PBI-1402 treatment on cellular response to this cytokine (data not shown). These results indicate that the presence of PBI-1402 most likely increases the generation of CFU-E progenitors by additive effect to Epo and SCF signalling.

Short term exposure of erythroid precursors to PBI-1402 enhances the phosphorylation of ERK1/2.

Activation of ERK1/2 and MEK1/2 is well known to promote cell proliferation and both signal transducers are known to be activated upon EpoR and/or KIT engagement. CD34⁺ cells were cultured for erythroid differentiation for 8 days, starved of cytokines for 4h and re-stimulated with Epo, SCF and PBI-1402 in different combinations. Cells cultured with 10 ng/ml SCF, 1 U/ml Epo and 0.2mM of PBI-1402 demonstrated enhanced phosphorylation of ERK1/2, from 5 to 30 minutes post re-stimulation, compared to cells that were not stimulated with PBI-1402 (Fig. 4A, lanes 1-6). Interestingly, cells cultured with PBI-1402 alone showed no ERK1/2 activation (lanes 7-9), indicating that PBI-1402 itself is not sufficient to induce phosphorylation of ERK1/2. Only a slight ERK1/2 activation was seen when cells were treated with a combination of Epo or SCF and PBI-1402 alone (Fig. 4B). Next, we investigated the effect of PBI-1402 on the upstream MAPKinase, MEK1/2. To determine if increased phosphorylation of ERK1/2 induced by PBI-1402 was specifically mediated by increased phosphorylation through MEK1/2, the cells were treated with 10 μ M of U0126, a MEK1/2 inhibitor. In the presence of U0126, ERK1/2 activation was lost in both groups, indicating that PBI-1402 induces ERK1/2

phosphorylation through a MEK1/2 dependent pathway (Fig. 4C). This result was further confirmed through observation that the PI3K/Akt and STAT-5 pathways, both implicated in SCF and Epo signalling, are not affected by the presence of 0.2 mM PBI-1402 (data not shown).

Enhanced ERK1/2 phosphorylation is due to low phosphatase phosphorylation.

Specific phosphatases are important members of regulatory mechanisms determining the level and duration of signal transducers activation. MAPK are negatively regulated by MKP-1 and other phosphatases. Since the observed changes in ERK1/2 phosphorylation could be explained by decreased dephosphorylation, we followed the changes of MKP-1 phosphorylation levels in the presence or absence of PBI-1402. Interestingly, cells exposed to PBI-1402 for 30 minutes post cytokine stimulation, showed lower MKP-1 phosphorylation compared to control (Fig. 5A). This result suggests that increased ERK/1/2 phosphorylation is at least in part due to PBI-1402 induced decrease in MKP-1 activity.

In the next set of experiments, we wanted to determine if similar changes of ERK/1/2 and MPK-1 activation could be observed during prolonged exposure to PBI-1402. CD34+ cells were cultured in primary hematopoietic cell media (also with all growth factors) in the presence or absence of 0.2mM PBI-1402 for 9 days. As with short-term exposure, PBI-1402 induced an increase in ERK1/2 phosphorylation and a decreased in MKP-1 phosphorylation from day 7 to day 9, when compared to control cells (Fig. 5B), indicating that PBI-1402 enhances mitogenic signalling delivered by Epo and SCF.

Oral administration of PBI-1402 significantly reduces erythropenia, accelerates peripheral blood recovery in myeloablated mice post transplantation.

Next, we wanted to determine if the *in vitro* increase of CFU-E progenitors in response to PBI-1402 could translate in faster *in vivo* erythroid reconstitution following BM transplantation. C57BL/6J mice were irradiated at 850 cGy and had syngeneic BM transplantation the day before the treatment begun. Daily oral administration of 100 or 200 mg/kg of PBI-1402 or PBS (control mice) was given to mice for a period of 16 days. Peripheral blood and BM analyses were then performed every 3 days. Oral administration of 200 mg/kg of PBI-1402 increased red blood cell (RBC) counts from day 4 to 16 post-transplantation (Fig. 6A). This resulted in a significantly smaller decrease in hemoglobin levels from day 4 to day 13 compared to control mice (Fig. 6B). Interestingly, even mice treated with half the dose (100 mg/kg) PBI-1402 showed intermediate RBC and hemoglobin level (Fig. 6A-B). To investigate the mechanism explaining PBI-1402 mediated RBC increase, the impact of oral administration of 200 mg/kg PBI-1402 on erythroid progenitors was measured in the BM of animals. PBI-1402 significantly increased the number of BFU-E (at day 7 and day 10) (Fig. 6C) and CFU-E (all observation points) (Fig. 6D) in the BM of treated mice compared to control mice. With 100 mg/kg PBI-1402, a significant increase in CFU-E number was also observed at day 7 and day 10 (Fig. 6C-D). Dose-response curve to Epo showed significant increase in CFU-E ($p < 0.05$) at all tested Epo concentrations. Again, no shift in the sensitivity to Epo for cells cultured with PBI-1402 compared to control group was detected (Fig. 6E). Experiments performed with graded concentrations of SCF (0 to 50 ng/ml) showed

no effect of PBI-1402 treatment on cellular response to this cytokine (data not shown).

Discussion

The present study investigated the ability of PBI-1402, a small lipid with oral bioavailability, to promote RBC expansion and studied its underlying mechanisms of action. PBI-1402 was found to expand erythroid progenitor cells *in vitro* through specific proliferation pathways. Furthermore, treatment with PBI-1402 significantly accelerated erythroid recovery of myeloablated mice following BM transplantation. Indeed, PBI-1402 demonstrated enhanced growth of erythroid progenitors.

EPO levels are expected to increase in myeloablated mice compared to their healthy counterparts, because of the need for expansion and terminal differentiation of EPC [48]. Supra-physiologic doses of Epo can be used to accelerate this process. However, we could achieve accelerated *in vivo* RBCs reconstitution through the use of a novel molecule, PBI-1402, without the addition of Epo. We found that the prevention of anemia was associated with a greater number of BFU-E and CFU-E in the bone marrow compared to control group ($p < 0.05$ to $p < 0.001$) indicating that the faster recovery of RBCs and hemoglobin levels after transplantation resulted from greater RBCs production. Cytokines such as IL-1, TNF-alpha, SCF and IL-12 are known to have a radio-protective effect on bone marrow precursor cells [49, 50]. It is also possible that PBI-1402 would act through a radio-protective effect on RBCs early post-transplantation. It may be particularly interesting to assess the impact of PBI-1402 on the above cytokines and measure its ability to modulate response to radiation.

The expansion of erythroid progenitors is critical for the physiological response to increased demands for new erythrocytes, such as those associated with

chronic blood loss, hemolytic anemia, chemotherapy or radiotherapy. Epo and SCF have been shown to synergistically increase EPCs expansion *in vitro* [20, 30, 51] and rhEpo is currently used as therapeutic agent for erythropoiesis [52, 53].

The *in vitro* erythroid colony assays provide a good model for studying the interaction between EPCs, Epo, SCF or other agents that stimulate cell proliferation and differentiation [54, 55]. The presence of PBI-1402 in a long-term culture media preserved BFU-E (which declined in control cultures) and increased the number of CFU-E in a heterogeneous cell population ($p < 0.05$), while no other cell lineages appeared to have been affected. In the conditions that specially induce erythroid differentiation [20, 28], PBI-1402 did not change the proliferation rate of cells studied. However, results obtained with MC media assays showed increased numbers of CFU-E from day 7 to day 9 in the presence of PBI-1402 ($p < 0.05$ to $p < 0.01$ compared to control).

In recent studies, hormones such as dexamethasone and androgens have been implicated in causing sustained proliferation of erythroid progenitor *in vitro* [56-59], whereas retinoic acid and thyroid hormone were found to promote erythroid differentiation [60-63]. From our results, PBI-1402, a small molecular weight lipid, could act like dexamethasone and androgens and promote the proliferation of the more mature erythroid progenitor cell compartment.

EPCs possess a vast heterogeneity in their sensitivity to cytokines. Increased sensitivity to Epo or other cytokines might be tightly regulated through negative signalling molecules associated with the cytokine receptors. Studies report that sensitivity to EpoR is increased in SOCS1-deficient fetal liver cells [64] or Lyn^{-/-}

spleen cells [65]. Other studies demonstrate that c-Kit, the SCF receptor, can have functional interaction with EpoR at the stage of CFU-E. This interaction is essential for these cells to be able to respond to Epo and undergo subsequent cell proliferation [17, 66, 67]. Dose-response experiments showed that PBI-1402 does not increase sensitivity to either Epo or SCF. This indicated that the mechanism by which PBI-1402 induces increased generation of CFU-E does not involve Epo/EpoR and SCF/KIT response directly but rather acts additively later in their signalling cascade most likely enhancing EPCs proliferation. Since no increase in BFU-E progenitors were observed in cultures exposed to PBI-1402, we hypothesized that the molecule might act at the stage of BFU-E to CFU-E transition, increasing the proliferative potential of intermediate cells (Fig. 7A). The fact that PBI-1402 results in an increase in BFU-E *in vivo* suggests the involvement of additional cytokines or a more physiologic environment than *in vitro* conditions.

Epo and SCF are located in a joint signalling complex at the plasma membrane and activate common signalling pathways such as PI3K, MAPK/ERK and STATs cascades [30, 66, 68]. The results obtained in our study indicate that the expansion of erythroid progenitors by PBI-1402 is due to an enhancement of intracellular signalling pathway that was described to be responsible for cell proliferation [35, 69, 70]. In human primary hematopoietic cell cultures, a supra-additive activation of MAPK in response to a combination of SCF and Epo was found to correlate with a synergistic erythroid cell expansion [29]. Presence of PBI-1402 in media demonstrated its ability to enhance and prolong ERK1/2 activity *in vitro*. The data also indicate that (i) it is a cooperative effect with SCF and Epo since

PBI-1402 alone has no effect on ERK1/2 phosphorylation and combination of all three molecules is needed to achieve increased ERK1/2 phosphorylation, (ii) it is a MEK-dependent pathway since the specific inhibition of MEK1/2 inhibits ERK1/2 phosphorylation and no effect on other pathways was detected and (iii) it is at least in part due to the inhibition of MKP-1 activity. The ERK/MAPK signalling pathway is essential for proliferation of early erythroid progenitors and duration of the signal is critical for cell signalling decision [34, 36]. Cellular response is determined by the availability of different transcription factors present in the cell at the time of signalling. Sustained ERKs activation is associated with translocation of ERKs in the nucleus, whereas transient activation does not result in translocation and leads to different pattern of gene expression [71-74]. Sustained activation of ERKs is associated with the proliferation in fibroblasts [75-77]. Studies on erythroid cell lines suggest that ERK/MAPK pathway plays a critical role in erythroid cell proliferation but has a negative role in erythroid differentiation, and that ERK1/2 might be down regulated at later stages of erythroid differentiation [35, 78]. In our study, PBI-1402 enhanced ERK1/2 phosphorylation. We also showed that MKP-1 phosphorylation is decreased in the presence of PBI-1402 indicating decreased activity of the phosphatase. MKP-1 is necessary to deactivate ERK1/2 in the nucleus. However, ERK1/2 has also been shown to increase MKP-1 degradation via the ubiquitin-proteasome pathway when constitutively active [41, 79]. Therefore, the observed decrease in MKP-1 phosphorylation can also be due to increase in MKP-1 degradation subsequent to prolonged ERK1/2 activation.

Nuclear hormones receptors, in addition to plasma membrane receptors (such as EpoR and KIT) are essential for many aspects of erythropoiesis *in vivo* [80, 81]. Steady-state erythropoiesis involves a limited number of “differentiation divisions” and is essentially controlled by Epo, while stress erythropoiesis is co-regulated by Epo, SCF and hormone ligands [32]. Recent evidence suggests that some lipid products act as second messengers, which directly activate enzymes such as Akt, PI3K or MAPK independently of Ras/Raf [38]. Taken together, these findings support the expansion of the erythroid pool by PBI-1402, which is able to induce ERK1/2 activation and via an Epo distinct pathway. Indeed, PBI-1402 does not activate the same pathways as Epo. STAT5 or PI3K are not activated by PBI-1402 (data not shown), it rather amplified the ERK1/2 signalling pathway by inhibiting MKP-1 action (Fig. 7B).

Conclusion

For the last decade, the treatment of anemia has relied mainly on rhEpo. Since only 60% of patients respond to increasing doses of rhEpo [82, 83], it is clear that there is a need for additional ESA. Moreover, recent discovery of functional Epo receptors on malignant cells raises definitive concerns about the promotion of carcinogenesis in certain patient subpopulations [9, 84, 85]. The present study demonstrated the immense potential of the novel molecule, PBI-1402, to reduce erythropenia and obviate the need for RBC transfusions. Most importantly, PBI-1402 should not be associated with the side effect observed with Epo, since it is a totally different molecule. In addition, PBI-1402 requires Epo and SCF and it is active at physiologic

concentrations of Epo and SCF rather than the supra-physiologic doses that need to be used clinically for Epo. Moreover, PBI-1402 acts through a signalling pathway distinct from that of Epo. Finally, PBI-1402 is the first orally bioavailable ESA. This represents a major advantage since it eliminates injections, with the need to undergo appropriate training, to acquire potentially risky materials (syringes, needles...) and to tolerate pain. Other molecules are also developed to treat anemia such as FG2216 [86]. Only these two molecules are orally active low molecular weight compounds in clinical trials and can stimulate erythropoiesis for the treatment of anemia. However, they are structurally very dissimilar. Thus, PBI-1402 may offer a safe protection from myeloablative therapy and accelerated recovery from remaining resident or transplanted stem cells.

Figure captions

Figure 1: *Proliferation of erythroid progenitors derived from G-PBMCs in response to PBI-1402.* G-PBMCs were cultured for 5 days in Myelocult media (horse serum, FBS, folic acid and i-inositol) in presence or absence of 0.5mM of PBI-0049. 5×10^4 cells/ dish were plated in MC medium (H4434) at day 0 and day 5 and the number of erythroid progenitors BFU-E **(A)**, CFU-E **(B)**, CFU-GM **(C)** and CFU-GEMM **(D)** was counted after 14 days using inverted microscope. Data represent the mean \pm SE. of 3 independent experiments, * $p < 0.05$.

Figure 2: *Generation of homogeneous population of erythroid precursor cells from CD34+ cells.* **(A)** CD34+, selected from mobilized blood cells, were cultured for 8 days to generate a homogenous population of erythroid progenitors as described in materials and methods. **(B).** Surface expression of CD34, CD71, CD36 and CD235a was both assessed at day 0 and 8, confirming the erythroid differentiation for majority of the cells in the culture.

Figure 3: *CD34+ cells derived erythroid progenitors generate greater number of CFU-E without change in sensitivity to Epo and SCF in response to PBI-1402.* **(A)** Cell expansion during 9 days-culture of CD34+ in presence or absence of 0.2mM of PBI-1402. The number of viable cells was evaluated daily using haemocytometer and trypan blue exclusion technique. The results are presented as absolute number of cells per culture. 10^4 cells/ dish were plated at different days in MC media (H4230) and **(B)** BFU-E and **(C)** CFU-E colonies were quantified. Sensitivity tests were

performed using 10^3 Day 6-CD34-erythroid differentiated cells/dish cultured in MC media at different **(D)** Epo concentration (0 to 4.5 U/ml) to quantify CFU-Es. Data analyses were performed using non-linear fitting. Cytokine concentrations are shown in log scale. Mean \pm SE, n= 3, *p<0.05, **p<0.01.

Figure 4: *Phosphorylation of ERK1/2, in response to PBI-1402, in CD34-erythroid differentiated cells.* Day 8 cells were washed free of serum and growth factors, incubated in serum and cytokine-free DMEM (4h) and then re-stimulated with 10ng/ml of SCF and 1U/ml of Epo (lanes 1-3), both cytokines plus 0.2mM of PBI-1402 (lanes 3-6) or PBI-1402 only (lanes 7-9) for the indicated time periods (min). Whole cell lysates (20 μ g/ml per lane) were separated on 10% SDS-PAGE and analysed by immunoblotting. **(A)** Phosphorylation (Thr202/Tyr204) of ERK1/2 (upper panel). **(B)** Activation of ERK1/2 in response to 10 ng/ml of SCF or/and 1 U/ml of Epo in the presence or not of 0.2 mM of PBI-1402. **(C)** Phosphorylation of ERK1/2 following inhibition of MEK1/2 with 10 μ M of U0126. Comparable protein loading in each lane and protein integrity were demonstrated by incubating the blot to respective antibodies that detect total ERK1/2 (lower panel). Ratios were calculated using respective phospho-antibodies on total antibodies band densities. Relative positions of molecular weight markers are shown on the left. Immunoblots are from one representative experiment result. n=8, *p<0.05.

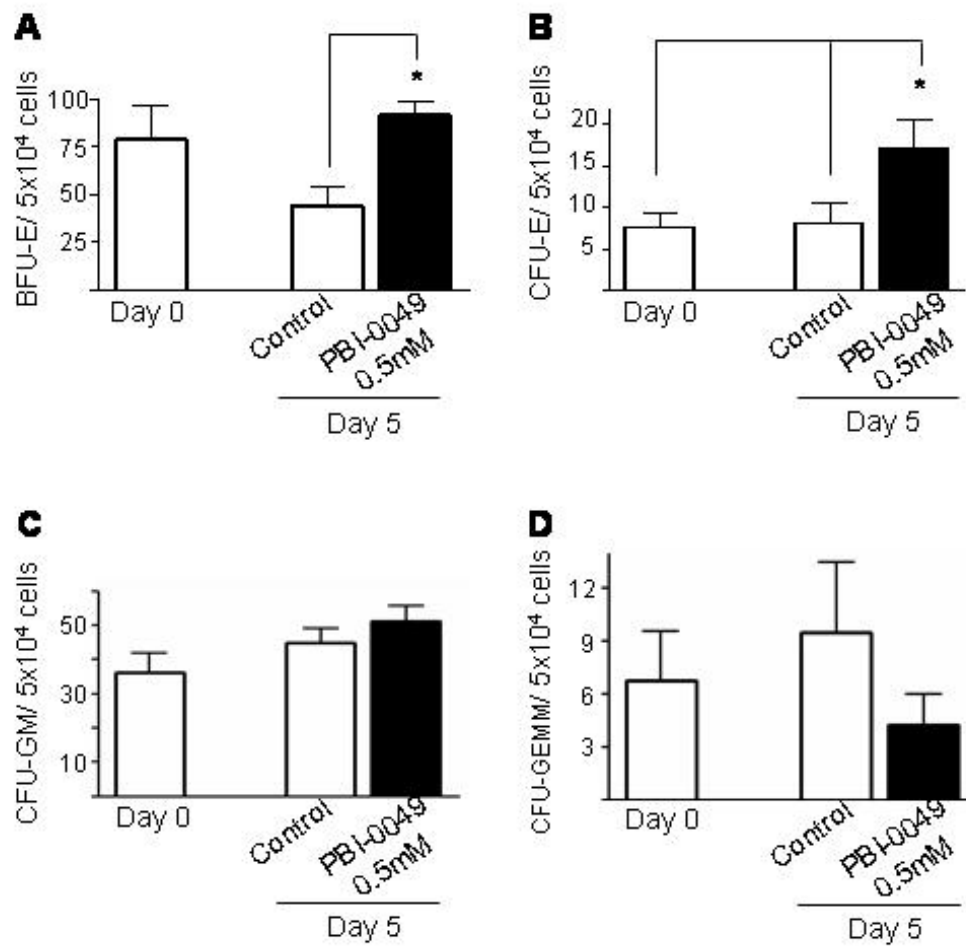
Figure 5: *MAPKinase phosphatase, MKP-1, activity in presence of PBI-1402.* The cells were prepared and Western blots performed as described in Fig. 4. **(A)**

Activation of MKP-1. Ratios of p-MKP1 (Ser359)/ pan-actin were calculated using corresponding band densities. Representative immunoblot is shown. Phosphorylation (Ser359) of MKP-1 (upper panel) and pan-actin (lower panel). **(B)** Long-term culture of CD34+ cells in the presence or absence of 0.2mM of PBI-1402. Phosphorylation (Thr202/Tyr204) of ERK1/2 (upper panel), p-MKP-1 and pan-actin (lower panel). Ratios were calculated using respective phospho-antibodies on total antibodies band densities (right). Relative positions of molecular weight markers are shown on the left. Mean +/- SE, n=3.

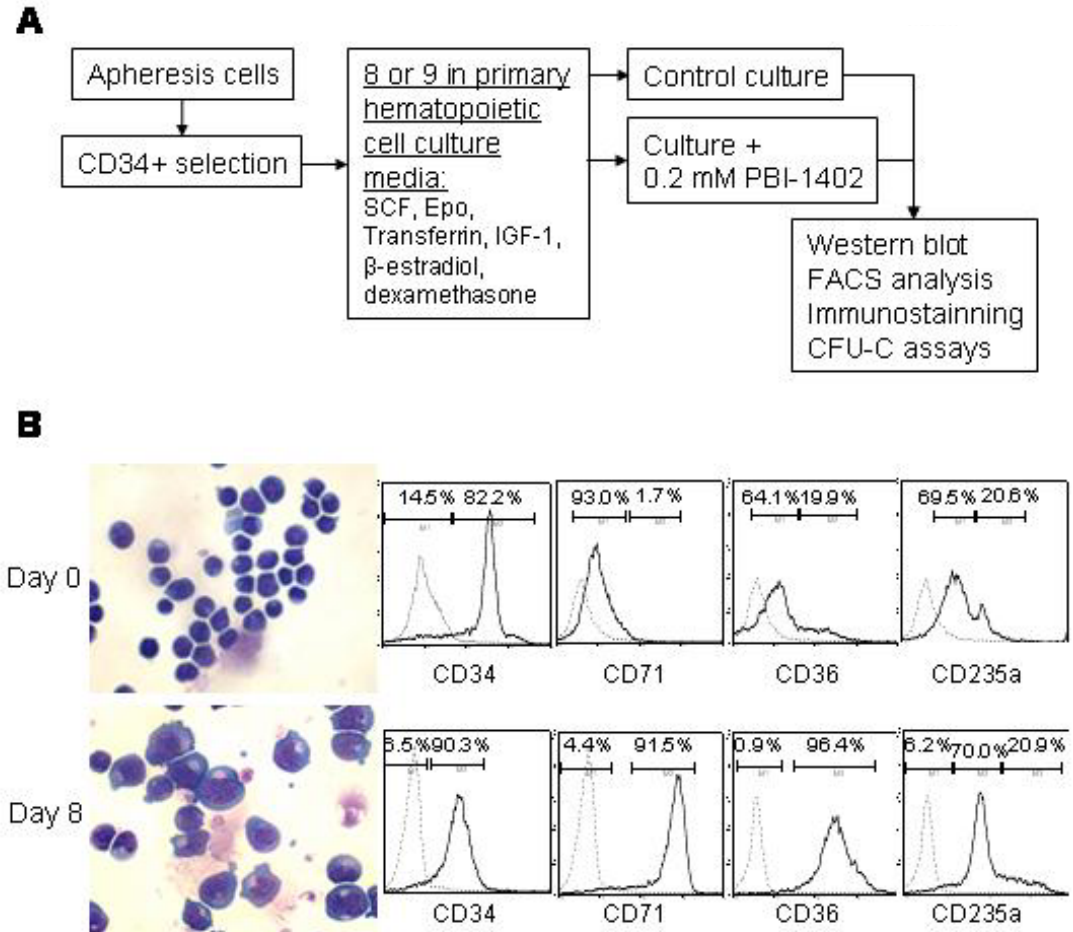
Figure 6: *In vivo administration of PBI-1402.* C57BL/J6 mice were lethally irradiated (850 cGy) and then transplanted with 5×10^5 bone marrow cells from syngeneic mice. Mice were treated daily with oral administration of 100 or 200 mg/kg of PBI-1402 or PBS and were then sacrificed at indicated days post-transplantation. Peripheral blood analyses were performed to monitor **(A)** red blood cells (RBC) and **(B)** hemoglobin (Hb) level in myeloablated mice post-transplantation. The data are shown as a percentage of RBC counts or Hb levels in healthy untreated mice. Mean +/- SE, n=12. *p<0.05, **p < 0.01, *** p<0.001. 2×10^4 and 2×10^5 of BM cells/dish were plated in MC medium to quantify **(C)** BFU-E and **(D)** CFU-E, respectively. **(E)** Sensitivity tests to Epo were performed as described in figure 3. Cytokines concentrations are shown in log scale.

Figure 7: *Proposed model illustrating the mechanism of action of PBI-1402.* PBI-1402 enhanced the phosphorylation of the mitogen-activated protein kinase Erk1/2.

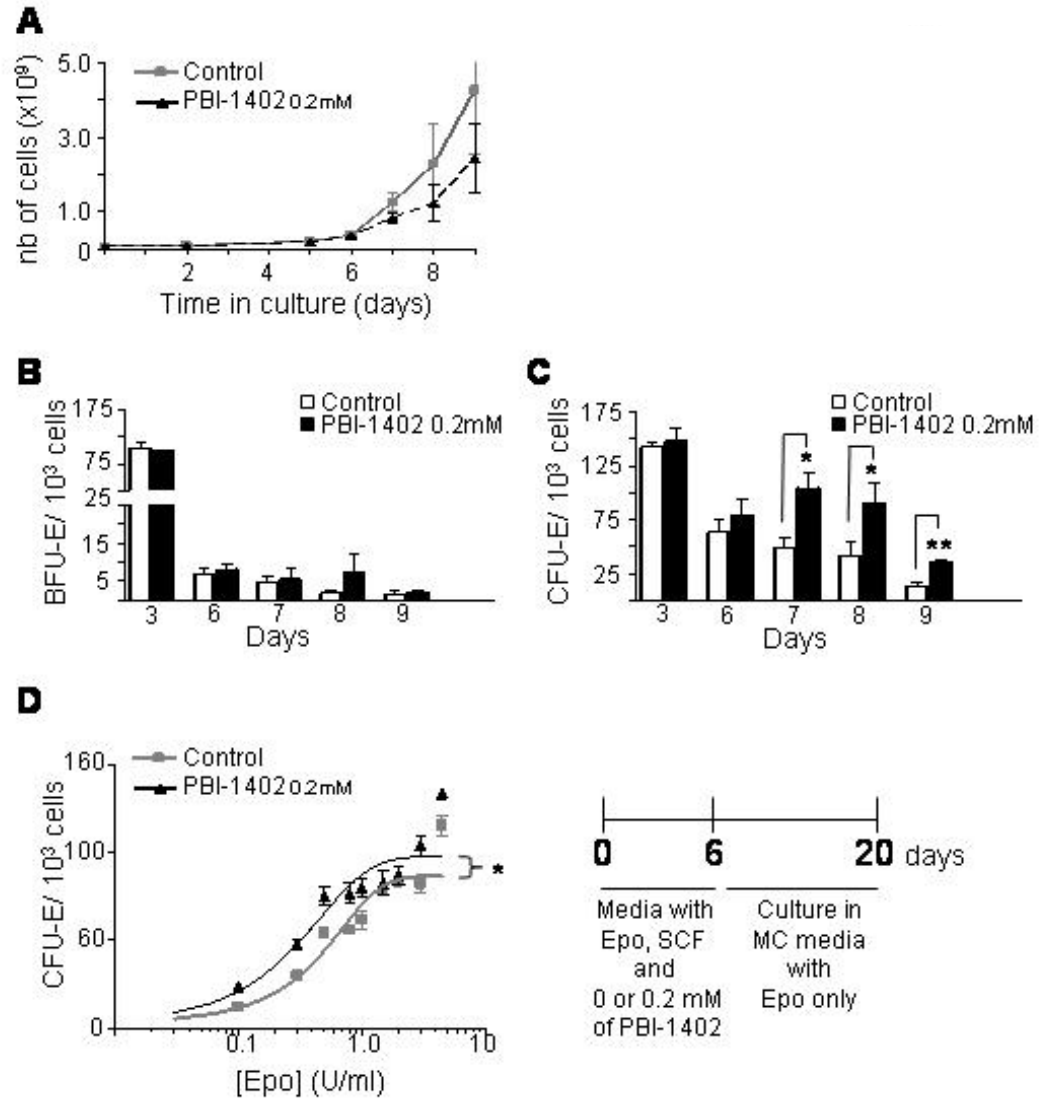
Inhibition of this pathway using indicated pharmacological inhibitors targeting Mek1/2 results in the suppression of PBI-1402 mediated Erk1/2 activation. Increased activation of MAPK is mediated by the inhibition of the MAPK phosphatase MKP-1 by PBI-1402. **(A)**. PBI-1402 increased the number of erythroid progenitors BFU-E and CFU-E, *in vitro* and *in vivo*. **(B)** Possible interactions with Epo and SCF receptors and other pathways which may also play a role in observed enhancement of BFU-E and CFU-E numbers.



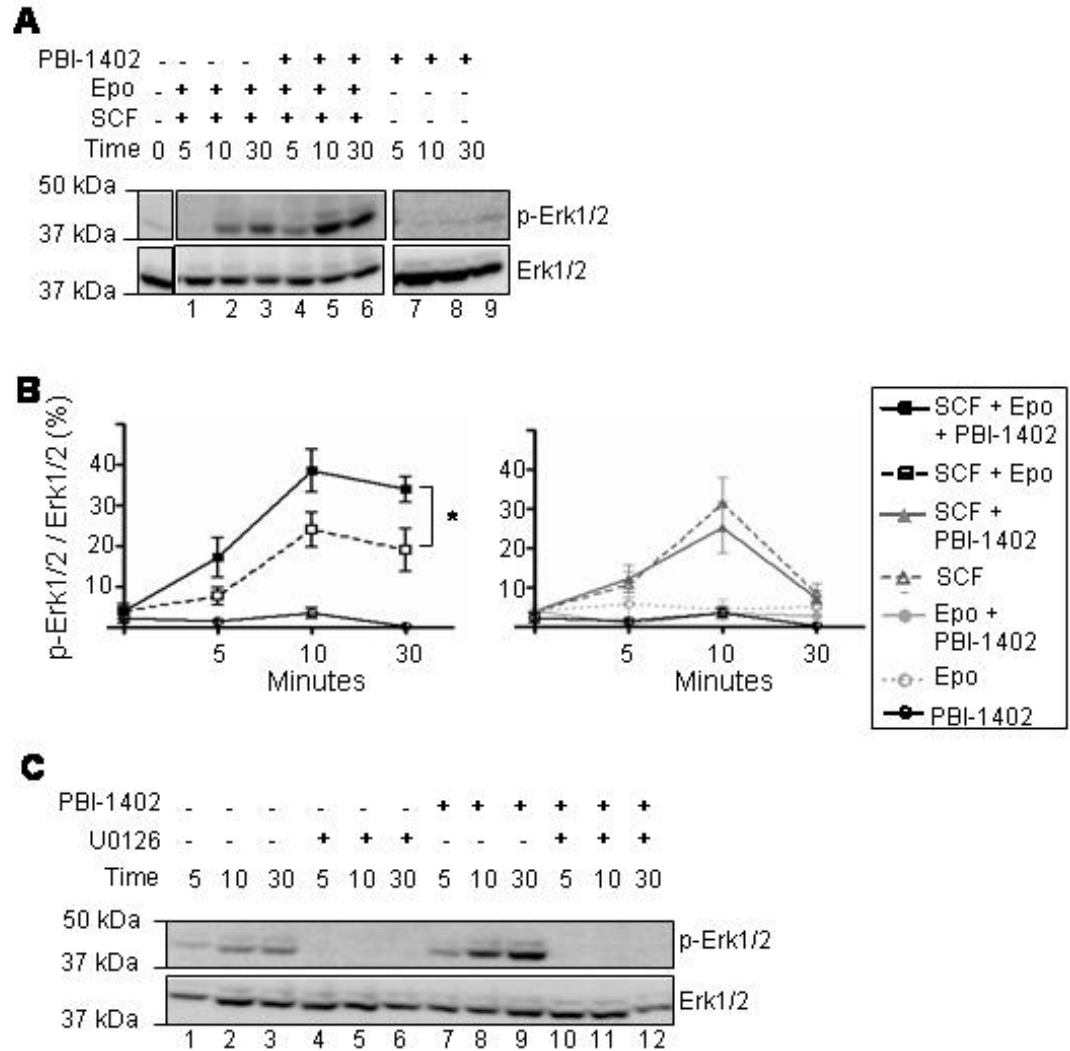
Sabrina Vinet et al., Fig. 1



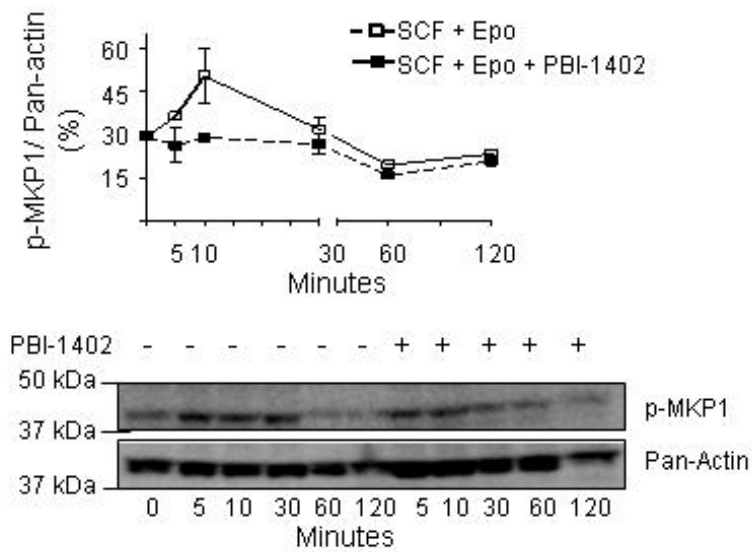
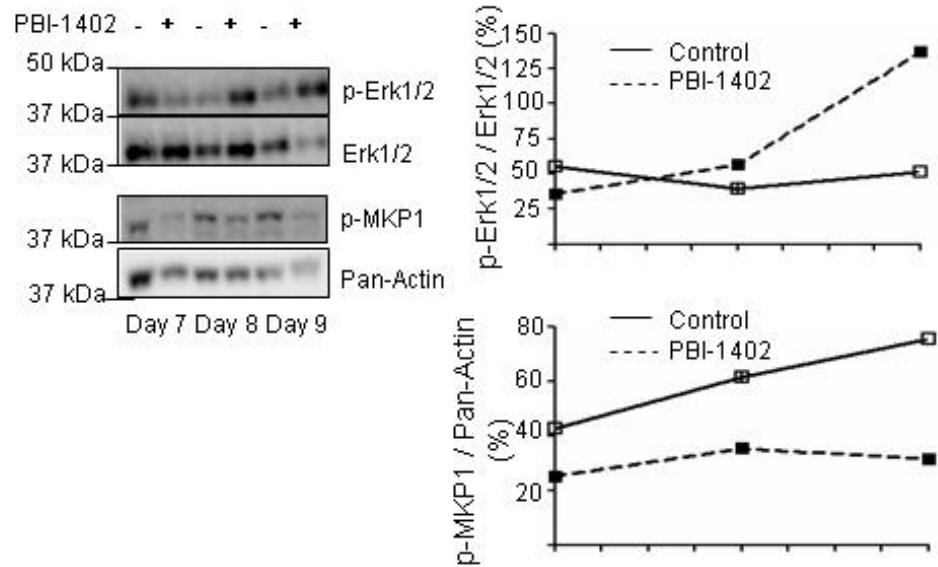
Sabrina Vinet et al., Fig. 2



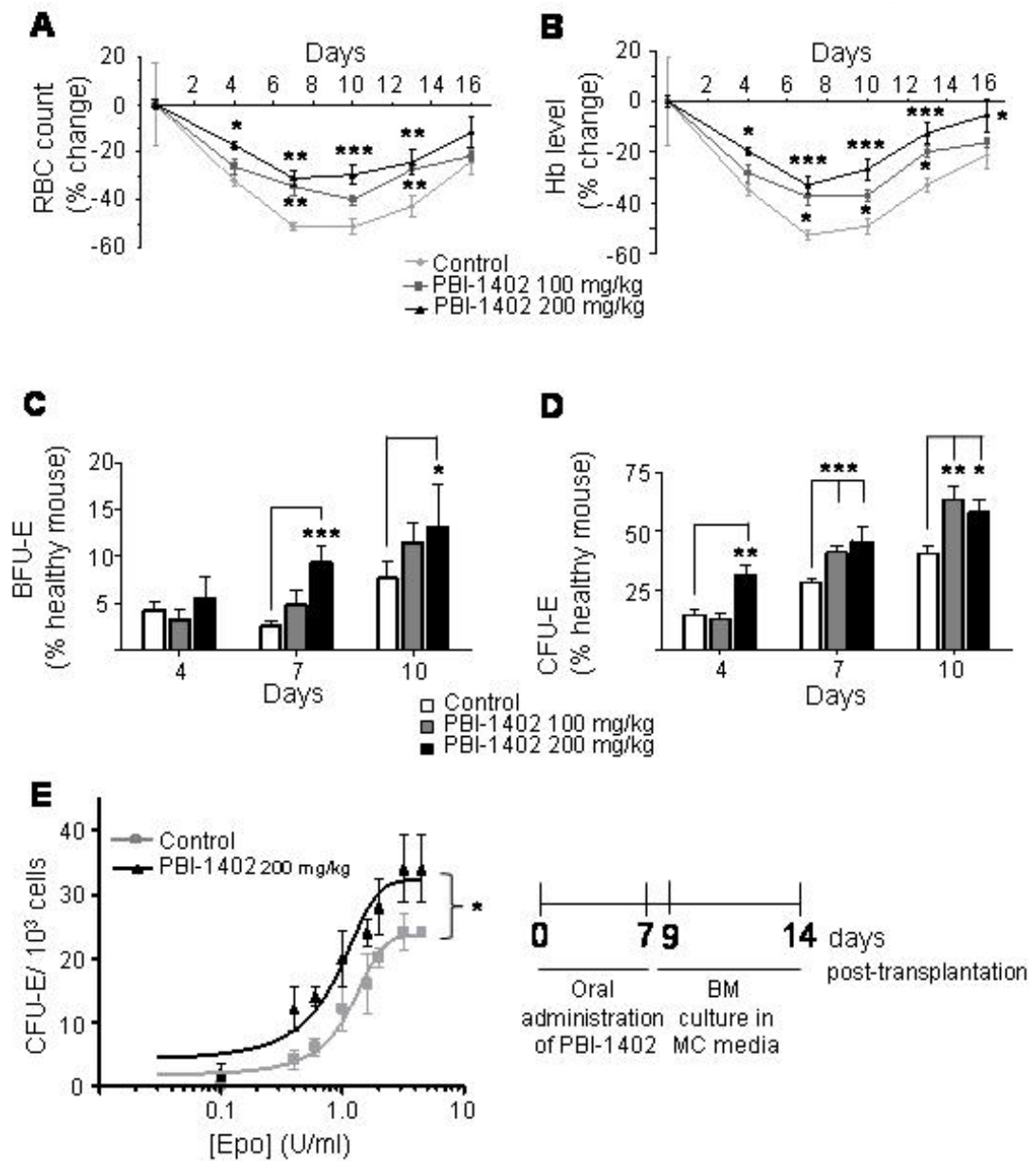
Sabrina Vinet et al., Fig. 3



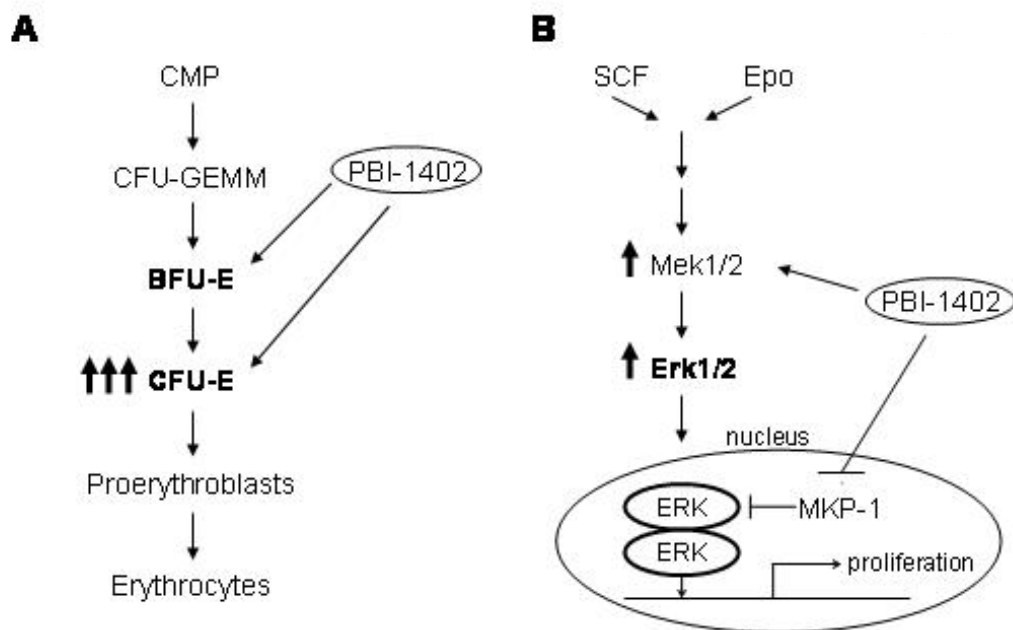
Sabrina Vinet et al., Fig. 4

A**B**

Sabrina Vinet et al., Fig. 5



Sabrina Vinet et al., Fig. 6



Sabrina Vinet et al., Fig. 7

References

- [1] Schwartz RN. Anemia in patients with cancer: incidence, causes, impact, management, and use of treatment guidelines and protocols. *Am J Health Syst Pharm.* 2007;64:S5-13; quiz S28-30.
- [2] Grogan M, Thomas GM, Melamed I, et al. The importance of hemoglobin levels during radiotherapy for carcinoma of the cervix. *Cancer.* 1999;86:1528-1536.
- [3] Laurie SA, Jeyabalan N, Nicholas G, MacRae R, Dahrouge S. Association between anemia arising during therapy and outcomes of chemoradiation for limited small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2006;1:146-151.
- [4] MacRae R, Shyr Y, Johnson D, Choy H. Declining hemoglobin during chemoradiotherapy for locally advanced non-small cell lung cancer is significant. *Radiother Oncol.* 2002;64:37-40.
- [5] Obermair A, Cheuk R, Horwood K, et al. Anemia before and during concurrent chemoradiotherapy in patients with cervical carcinoma: Effect on progression-free survival. *Int J Gynecol Cancer.* 2003;13:633-639.
- [6] Rudat V, Dietz A, Schramm O, et al. Prognostic impact of total tumor volume and hemoglobin concentration on the outcome of patients with advanced head and neck cancer after concomitant boost radiochemotherapy. *Radiother Oncol.* 1999;53:119-125.
- [7] Rezaei Kalantari H. Surveillance et effets secondaires des transfusions. *Rev Med Liege.* 2002;57:385-388.
- [8] Del Vecchio L, Locatelli F. New erythropoiesis-stimulating agents: how innovative are they? *Contrib Nephrol.* 2008;161:255-260.
- [9] Megalakaki C. Erythropoietin in cancer: the new face of an old friend. *J BUON.* 2008;13:7-16.
- [10] Elliott S. Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport. *Br J Pharmacol.* 2008;154:529-541.
- [11] Hsieh MM, Linde NS, Wynter A, et al. HIF prolyl hydroxylase inhibition results in endogenous erythropoietin induction, erythrocytosis, and modest fetal hemoglobin expression in rhesus macaques. *Blood.* 2007;110:2140-2147.
- [12] Gagnon L. PBI-1402, Non Confidential Executive Summary 4. ProMetic BioSciences Inc; 2007. p. 5.
- [13] Erickson-Miller CL, Creasy C, Chadderton A, et al. GSK626616: a DYRK3 inhibitor as a potential new therapy for the treatment of anemia. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts).* 2007;110:Abstract 510.
- [14] Krantz SB. Erythropoietin. *Blood.* 1991;77:419-434.
- [15] Metcalf D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? *Blood.* 1993;82:3515-3523.
- [16] Sui X, Tsuji K, Tajima S, et al. Erythropoietin-independent erythrocyte production: signals through gp130 and c-kit dramatically promote erythropoiesis from human CD34+ cells. *J Exp Med.* 1996;183:837-845.
- [17] Wu H, Klingmuller U, Acurio A, Hsiao JG, Lodish HF. Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:1806-1810.

- [18] Sivertsen EA, Hystad ME, Gutzkow KB, et al. PI3K/Akt-dependent Epo-induced signalling and target genes in human early erythroid progenitor cells. *Br J Haematol.* 2006;135:117-128.
- [19] Knowles DM. *Neoplastic Hematopathology*, Second ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
- [20] Arcasoy MO, Jiang X. Co-operative signalling mechanisms required for erythroid precursor expansion in response to erythropoietin and stem cell factor. *Br J Haematol.* 2005;130:121-129.
- [21] Richmond TD, Chohan M, Barber DL. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol.* 2005;15:146-155.
- [22] Ronzoni L, Bonara P, Rusconi D, Frugoni C, Libani I, Cappellini MD. Erythroid differentiation and maturation from peripheral CD34+ cells in liquid culture: cellular and molecular characterization. *Blood Cells Mol Dis.* 2008;40:148-155.
- [23] Grebien F, Kerenyi MA, Kovacic B, et al. Stat5 activation enables erythropoiesis in the absence of EpoR and Jak2. *Blood.* 2008;111:4511-4522.
- [24] Sawada K, Krantz SB, Dai CH, et al. Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *J Cell Physiol.* 1990;142:219-230.
- [25] Miller BA, Floros J, Cheung JY, et al. Steel factor affects SCL expression during normal erythroid differentiation. *Blood.* 1994;84:2971-2976.
- [26] Lin CS, Lim SK, D'Agati V, Costantini F. Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev.* 1996;10:154-164.
- [27] Wang W, Horner DN, Chen WL, Zandstra PW, Audet J. Synergy between erythropoietin and stem cell factor during erythropoiesis can be quantitatively described without co-signaling effects. *Biotechnol Bioeng.* 2008;99:1261-1272.
- [28] Panzenbock B, Bartunek P, Mapara MY, Zenke M. Growth and differentiation of human stem cell factor/erythropoietin-dependent erythroid progenitor cells in vitro. *Blood.* 1998;92:3658-3668.
- [29] Sui X, Krantz SB, You M, Zhao Z. Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. *Blood.* 1998;92:1142-1149.
- [30] Munugalavadla V, Kapur R. Role of c-Kit and erythropoietin receptor in erythropoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005;54:63-75.
- [31] Cheung JY, Miller BA. Molecular mechanisms of erythropoietin signaling. *Nephron.* 2001;87:215-222.
- [32] Kolbus A, Blazquez-Domingo M, Carotta S, et al. Cooperative signaling between cytokine receptors and the glucocorticoid receptor in the expansion of erythroid progenitors: molecular analysis by expression profiling. *Blood.* 2003;102:3136-3146.
- [33] Schmidt EK, Fichelson S, Feller SM. PI3 kinase is important for Ras, MEK and Erk activation of Epo-stimulated human erythroid progenitors. *BMC Biol.* 2004;2:7.
- [34] Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell.* 1995;80:179-185.

- [35] Kolonics A, Apati A, Janossy J, et al. Activation of Raf/ERK1/2 MAP kinase pathway is involved in GM-CSF-induced proliferation and survival but not in erythropoietin-induced differentiation of TF-1 cells. *Cell Signal*. 2001;13:743-754.
- [36] Dazy S, Damiola F, Parisey N, Beug H, Gandrillon O. The MEK-1/ERKs signalling pathway is differentially involved in the self-renewal of early and late avian erythroid progenitor cells. *Oncogene*. 2003;22:9205-9216.
- [37] Bugarski D, Krstic A, Mojsilovic S, et al. Signaling pathways implicated in hematopoietic progenitor cell proliferation and differentiation. *Exp Biol Med* (Maywood). 2007;232:156-163.
- [38] Klingmuller U, Wu H, Hsiao JG, et al. Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:3016-3021.
- [39] Pace BS, White GL, Dover GJ, Boosalis MS, Faller DV, Perrine SP. Short-chain fatty acid derivatives induce fetal globin expression and erythropoiesis in vivo. *Blood*. 2002;100:4640-4648.
- [40] Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*. 2007;26:3203-3213.
- [41] Lin YW, Yang JL. Cooperation of ERK and SCF^{Skp2} for MKP-1 destruction provides a positive feedback regulation of proliferating signaling. *J Biol Chem*. 2006;281:915-926.
- [42] Keyse SM. Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity. *Semin Cell Dev Biol*. 1998;9:143-152.
- [43] Reffas S, Schlegel W. Compartment-specific regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by ERK-dependent and non-ERK-dependent inductions of MAPK phosphatase (MKP)-3 and MKP-1 in differentiating P19 cells. *Biochem J*. 2000;352 Pt 3:701-708.
- [44] Cheung JO, Casals-Pascual C, Roberts DJ, Watt SM. A small-scale serum-free liquid cell culture model of erythropoiesis to assess the effects of exogenous factors. *J Immunol Methods*. 2007;319:104-117.
- [45] Neildez-Nguyen TM, Wajcman H, Marden MC, et al. Human erythroid cells produced ex vivo at large scale differentiate into red blood cells in vivo. *Nat Biotechnol*. 2002;20:467-472.
- [46] di Giacomo V, Matteucci A, Stellacci E, et al. Expression of signal transduction proteins during the differentiation of primary human erythroblasts. *J Cell Physiol*. 2005;202:831-838.
- [47] Dorn I, Lazar-Karsten P, Boie S, et al. In vitro proliferation and differentiation of human CD34⁺ cells from peripheral blood into mature red blood cells with two different cell culture systems. *Transfusion*. 2008.
- [48] Papayannopoulou T. Biologic effects of thrombopoietin, the Mpl ligand, and its therapeutic potential. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1996;38 Suppl:S69-73.
- [49] Dalmau SR, Freitas CS, Savino W. Radio- and chemoprotection of bone marrow cells by opposite cell cycle-acting cytokines. *Leuk Res*. 1997;21:93-99.
- [50] Maddens S, Charruyer A, Plo I, et al. Kit signaling inhibits the sphingomyelin-ceramide pathway through PLC gamma 1: implication in stem cell factor radioprotective effect. *Blood*. 2002;100:1294-1301.

- [51] von Lindern M, Schmidt U, Beug H. Control of erythropoiesis by erythropoietin and stem cell factor: a novel role for Bruton's tyrosine kinase. *Cell Cycle*. 2004;3:876-879.
- [52] Kendall RG. Erythropoietin. *Clin Lab Haematol*. 2001;23:71-80.
- [53] Rizzo JD, Somerfield MR, Hagerty KL, et al. Use of epoetin and darbepoetin in patients with cancer: 2007 American Society of Clinical Oncology/American Society of Hematology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2008;26:132-149.
- [54] Prchal JF, Adamson JW, Steinmann L, Fialkow PJ. Human erythroid colony formation in vitro: evidence for clonal origin. *J Cell Physiol*. 1976;89:489-492.
- [55] Misiti J, Spivak JL. Erythropoiesis in vitro. Role of calcium. *J Clin Invest*. 1979;64:1573-1579.
- [56] Schroeder C, Gibson L, Nordstrom C, Beug H. The estrogen receptor cooperates with the TGF alpha receptor (c-erbB) in regulation of chicken erythroid progenitor self-renewal. *EMBO J*. 1993;12:951-960.
- [57] Steinlein P, Wessely O, Meyer S, Deiner EM, Hayman MJ, Beug H. Primary, self-renewing erythroid progenitors develop through activation of both tyrosine kinase and steroid hormone receptors. *Curr Biol*. 1995;5:191-204.
- [58] Beug H, Steinlein P, Bartunek P, Hayman MJ. Avian hematopoietic cell culture: in vitro model systems to study oncogenic transformation of hematopoietic cells. *Methods Enzymol*. 1995;254:41-76.
- [59] Wessely O, Deiner EM, Beug H, von Lindern M. The glucocorticoid receptor is a key regulator of the decision between self-renewal and differentiation in erythroid progenitors. *EMBO J*. 1997;16:267-280.
- [60] Zenke M, Munoz A, Sap J, Vennstrom B, Beug H. v-erbA oncogene activation entails the loss of hormone-dependent regulator activity of c-erbA. *Cell*. 1990;61:1035-1049.
- [61] Schroeder C, Gibson L, Zenke M, Beug H. Modulation of normal erythroid differentiation by the endogenous thyroid hormone and retinoic acid receptors: a possible target for v-erbA oncogene action. *Oncogene*. 1992;7:217-227.
- [62] Baretino D, Bugge TH, Bartunek P, et al. Unliganded T3R, but not its oncogenic variant, v-erbA, suppresses RAR-dependent transactivation by titrating out RXR. *EMBO J*. 1993;12:1343-1354.
- [63] Bartunek P, Zenke M. Retinoid X receptor and c-erbA/thyroid hormone receptor regulate erythroid cell growth and differentiation. *Mol Endocrinol*. 1998;12:1269-1279.
- [64] Sarna MK, Ingley E, Busfield SJ, et al. Differential regulation of SOCS genes in normal and transformed erythroid cells. *Oncogene*. 2003;22:3221-3230.
- [65] Tong W, Zhang J, Lodish HF. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood*. 2005;105:4604-4612.
- [66] Wu H, Klingmuller U, Besmer P, Lodish HF. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature*. 1995;377:242-246.
- [67] Boer AK, Drayer AL, Vellenga E. Stem cell factor enhances erythropoietin-mediated transactivation of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) via the PKA/CREB pathway. *Exp Hematol*. 2003;31:512-520.

- [68] von Lindern M, Deiner EM, Dolznig H, et al. Leukemic transformation of normal murine erythroid progenitors: v- and c-ErbB act through signaling pathways activated by the EpoR and c-Kit in stress erythropoiesis. *Oncogene*. 2001;20:3651-3664.
- [69] Liebmann C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal*. 2001;13:777-785.
- [70] Anderson DH. Role of lipids in the MAPK signaling pathway. *Prog Lipid Res*. 2006;45:102-119.
- [71] Traverse S, Gomez N, Paterson H, Marshall C, Cohen P. Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor. *Biochem J*. 1992;288 (Pt 2):351-355.
- [72] Traverse S, Seedorf K, Paterson H, Marshall CJ, Cohen P, Ullrich A. EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. *Curr Biol*. 1994;4:694-701.
- [73] Nguyen TT, Scimeca JC, Filloux C, Peraldi P, Carpentier JL, Van Obberghen E. Co-regulation of the mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1, and the 90-kDa ribosomal S6 kinase in PC12 cells. Distinct effects of the neurotrophic factor, nerve growth factor, and the mitogenic factor, epidermal growth factor. *J Biol Chem*. 1993;268:9803-9810.
- [74] Dikic I, Schlessinger J, Lax I. PC12 cells overexpressing the insulin receptor undergo insulin-dependent neuronal differentiation. *Curr Biol*. 1994;4:702-708.
- [75] Meloche S, Seuwen K, Pages G, Pouyssegur J. Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol Endocrinol*. 1992;6:845-854.
- [76] Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, et al. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science*. 1994;265:966-970.
- [77] Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell*. 1994;77:841-852.
- [78] Uchida M, Kirito K, Shimizu R, Miura Y, Ozawa K, Komatsu N. A functional role of mitogen-activated protein kinases, erk1 and erk2, in the differentiation of a human leukemia cell line, UT-7/GM: a possible key factor for cell fate determination toward erythroid and megakaryocytic lineages. *Int J Hematol*. 2001;73:78-83.
- [79] Lin YW, Chuang SM, Yang JL. ERK1/2 achieves sustained activation by stimulating MAPK phosphatase-1 degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*. 2003;278:21534-21541.
- [80] Bauer A, Tronche F, Wessely O, et al. The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes Dev*. 1999;13:2996-3002.
- [81] Moliterno A, Spivak JL. Erythropoiesis. In: Anderson KC NP, ed. *Scientific basis of transfusion medicine* 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2000. p. 1-12.
- [82] Del Vecchio L, Pozzoni P, Andrulli S, Locatelli F. Inflammation and resistance to treatment with recombinant human erythropoietin. *J Ren Nutr*. 2005;15:137-141.

- [83] Johnson DW, Pollock CA, Macdougall IC. Erythropoiesis-stimulating agent hyporesponsiveness. *Nephrology (Carlton)*. 2007;12:321-330.
- [84] Hardee ME, Arcasoy MO, Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Dewhirst MW. Erythropoietin biology in cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12:332-339.
- [85] Udupa KB. Functional significance of erythropoietin receptor on tumor cells. *World J Gastroenterol*. 2006;12:7460-7462.
- [86] Wiesener MS, Schmieder RE, Guenzler V, Eckardt K-U. The prolylhydroxylase inhibitor FG2216 stimulates EPO production in nephric and anephric dialysis patients - evidence for an underutilized production capacity in liver and kidneys. *American Society of Nephrology Renal week 2007*. 2007;Abstract SA-PO784.

DISCUSSION des RÉSULTATS

10 - Discussion

La stratégie de traitement à base de chimiothérapie intensive et de GCSH a permis d'augmenter le taux de rémission complète et la survie des patients atteints de myélomes multiples et de lymphomes en rechute [30]. Par contre, ces traitements entraînent plusieurs effets secondaires dont la fatigue et l'augmentation du risque d'hémorragie et d'infection suite à la destruction des cellules du sang produisant les plaquettes, les érythrocytes et les leucocytes. Ces patients doivent donc recevoir régulièrement des transfusions sanguines afin de pallier l'anémie. Cependant, les transfusions sanguines impliquent aussi des risques d'infections virales et bactériennes, augmentent le risque de réactions immunitaires et diminuent la qualité de vie des patients [139]. L'utilisation des ASE dont l'rhEpo a permis de diminuer les besoins de transfusions érythrocytaires [140]. Par contre, plusieurs études sur les ASE ont soulevé des inquiétudes face à l'utilisation de ces substances. En effet, la découverte de récepteurs de l'Epo fonctionnels sur des cellules cancéreuses et la diminution de la survie de certains patients utilisant ce type de traitement a fait réagir la FDA qui a émis un avis sur l'utilisation des ASE [6]. L'utilisation de l'Epo est aussi un traitement coûteux et demande de nombreuses injections sous-cutanées qui impliquent une formation adéquate, l'utilisation de matériel nécessitant des précautions particulières (seringues, aiguilles, etc) et causent une douleur locale et un inconfort non négligeable. De plus, 35 à 40% des patients montrent une résistance à ce type de traitement [86, 141]. Il y a donc place à de nouveaux traitements moins coûteux et plus sécuritaires qui sauront répondre aux besoins de la population.

10.1 – Pertinence du projet

L'élimination de l'anémie associée à la chimiothérapie intensive ou la G-CSH ainsi que des besoins transfusionnels qui y sont associés serait très avantageux vu les coûts majeurs associés à ces types de traitement, coûts qui peuvent s'élever à plus de 100 000 \$ par année. La découverte de nouveaux traitements moins coûteux et aussi ou plus efficaces constituerait un avantage certain. L'utilisation de facteurs de croissance entraîne aussi de nombreux effets secondaires associés à leur large spectre d'action. L'utilisation de cytokines, comme le G-CSF ou l'Epo, ayant un champ d'action limité représente un avantage. Plusieurs médicaments sont en développement dans le but de prévenir ou de traiter la cytopénie. Ainsi, les stéroïdes et la cyclosporine ont démontré leur potentiel comme traitements alternatifs contre l'anémie et la thrombocytopénie d'origine immune dans les cas de leucémies lymphoblastiques chroniques [142].

Le PBI-1402 s'avère être une nouvelle molécule très prometteuse pour le traitement de l'anémie associée ou non à la chimiothérapie. Un de ses avantages, est qu'il peut être administré par voie orale et comme c'est une molécule synthétique, il pourrait être vendu à un coût moindre que les agents comme l'Epo.

10.2 – But du projet et résultats obtenus

Le but du projet était de déterminer la capacité du PBI-1402 à contrer l'anémie. Nous avons procédé à l'évaluation de la capacité d'expansion des

progéniteurs érythroïdes du PBI-1402 à la fois *in vitro* et *in vivo*. Nous avons aussi évalué son effet sur des cellules d'origine murine et d'origine humaine. Enfin, nous avons étudié son mécanisme d'action.

Dans un premier temps, nous avons démontré la capacité du PBI-1402 à induire la prolifération des progéniteurs érythroïdes d'abord à partir d'une population de cellules mononucléées provenant du sang et ensuite à partir d'une population de cellules CD34+ enrichies à partir de sang mobilisé au G-CSF.

La seconde partie du projet consistait à déterminer le mécanisme d'action impliqué dans l'expansion des progéniteurs érythroïdes humains. Plusieurs voies de signalisation intracellulaire ont été étudiées et nous avons déterminé que la voie de signalisation des MAPK était activée lors de l'exposition au PBI-1402.

Finalement, nous avons démontré la capacité du PBI-1402 à induire la prolifération *in vivo* des progéniteurs érythroïdes ainsi qu'à restaurer rapidement un niveau acceptable de globules rouges afin de diminuer les besoins transfusionnels.

Le PBI-1402 semble donc très prometteur pour son utilisation clinique dans le traitement de l'anémie.

11 – Expansion des progéniteurs érythroïdes humains

L'expansion des progéniteurs érythroïdes est un phénomène naturel et vital afin de préserver l'homéostasie, et aussi répondre aux demandes de l'organisme lors de situation de crise impliquant des pertes sanguine, ou suite à des traitements myéloablasifs à base de chimiothérapie ou de radiothérapie. De nombreuses études ont démontré que la combinaison du SCF et de l'Epo avait un effet synergique sur l'expansion des progéniteurs érythroïdes *in vitro* [43, 62, 143]. L'ajout de SCF pourrait donc permettre de favoriser une reconstitution hématopoïétique plus rapide. La génération de progéniteurs érythroïdes primitifs, comme les BFU-E, à partir de progéniteurs pluripotents est possible grâce à la présence du SCF et de facteurs additionnels tels que l'IL-3 et le GM-CSF et ne requiert pas la présence de l'Epo. Par contre, la survie des CFU-E est Epo dépendante et requiert aussi la présence d'IL-3, de GM-CSF, d'IL-9 ou de SCF [144]. Par contre, des études ont démontré que seul le SCF et l'Epo étaient essentiels et ne jouait pas un rôle redondant dans l'érythropoïèse [88, 89, 145].

11.1 – Expansion des PEryth humains par le PBI-1402 à partir de cellules progénitrices obtenues du sang mobilisé

Le sang de donneurs sains contient des progéniteurs hématopoïétiques mais leur nombre est nettement accru suite à l'exposition à des FCH comme le G-CSF, qui induit une mobilisation des progéniteurs de la MO vers le sang. De plus, le sang

mobilisé au G-CSF contient à la fois des progéniteurs matures capables d'une reconstitution hématopoïétique à court terme et de même que des CS primitives essentielles pour la reconstitution à long terme de la MO [60, 61]. L'utilisation d'un milieu de culture, le myelocult (StemCell Technologies), qui initie et supporte le maintien des progéniteurs myéloïdes à long terme pour des cultures de CSH a permis de mesurer l'effet du PBI-1402 sur une période de cinq jours. Notre hypothèse de travail était que le PBI-1402 devait avoir un effet de stimulation de l'érythropoïèse. Lorsque nous avons exposé des cellules progénitrices sanguines au PBI-0049 (une pro-drogue, semblable au PBI-1402, utilisée jadis pour la culture cellulaire), nous avons observé une augmentation des PEryth les plus matures (CFU-E) ($p < 0,05$). De plus, le PBI-0049 a aussi amené un maintien du nombre de progéniteurs plus primitifs (BFU-E) ($p < 0,05$). Par contre, aucune différence n'a été observée en présence de PBI-0049 en ce qui attrait aux autres progéniteurs comme les CFU-GEMM et CFU-GM. L'effet d'expansion des CFU-E et le maintien du nombre de BFU-E pour les cellules traitées au PBI-0049 par rapport aux cellules non traitées pourraient être dus à plusieurs mécanismes. De façon à mieux étudier les voies de signalisation impliquées, nous avons utilisé des conditions de culture permettant un enrichissement considérable en PEryth.

11.2 – Mise au point d'un système de culture pour l'expansion des PEryth

Comme le sang contient des cellules d'origine diverses et à plusieurs stades de maturation différents, nous avons préféré étudier une population de progéniteurs

érythroïdes qui soit plus homogène. L'utilisation de lignées cellulaires n'était pas appropriée car ces cellules ont subi de nombreuses mutations et peuvent donc avoir des mécanismes de signalisation intracellulaire différents de la réalité des cellules saines. Fibach et ses collègues furent les premiers à mettre au point un système de culture liquide capable de supporter l'érythropoïèse *in vitro* [146, 147]. Leur méthode, un procédé en deux phases, consiste à cultiver des cellules mononucléées du sang pendant sept jours dans un milieu composé de sérum, de cyclosporine A et de milieu conditionné à partir d'une lignée de cellules provenant d'un carcinome de la vessie et contenant des facteurs de croissance (SCF, GM-CSF, IL-3 et IL-6). La deuxième phase consiste à cultiver les cellules pendant 14 jours dans du sérum contenant de l'Epo afin d'obtenir une maturation complète. Nous avons donc utilisé ce même principe, mais adapté de façon à générer des PEryth en grande quantité [43, 148]. Cette technique modifiée était aussi un procédé en deux phases, mais pour nos besoins, seule la première phase a été réalisée. Les PEryth générés à partir de cellules CD34+ sélectionnées de cellules sanguines mobilisées, sont SCF et Epo dépendantes et ont besoin d'hormones de croissances telles que l'IGF-1, la dexaméthasone et la β -oestradiol afin de se différencier. Ces FCH ont démontré leur potentiel à soutenir le développement de globules rouges [93]. Il a aussi été démontré que la dexaméthasone et le SCF empêchaient la différenciation spontanée des PEryth [127, 149].

L'expression des marqueurs de surface érythroïdes est strictement régulée durant la maturation érythroïde *in vivo*. Tel que prédit, notre modèle a permis aux

cellules CD34⁺ de proliférer et de se différencier *in vitro* en PEryth. En effet, les lames colorées au Wright-Giemsa révèlent des cellules uniformes qui ont la morphologie des PEryth avec un cytoplasme basophile, des zones perinucléaires et une chromatine condensée [53]. De plus, ces cellules ont acquis au cours de leur différenciation les marqueurs de surface CD36 [150], CD71 [54] et CD235a intermédiaire [151], ce qui indique qu'elles sont bien des PEryth. CD36 est exprimé à la surface des PEryth primitifs jusqu'au stage de réticulocyte où il ne sera plus exprimé [152], tandis que le récepteur de la transferrine, le CD71, est exprimé sur les cellules érythroïdes primitives ayant besoin de grande quantité de fer pour former l'hémoglobine [153, 154]. Il est important de noter que notre population cellulaire CD34⁺ de départ était majoritairement CD36 et CD71 négative.

11.2.1 – Le PBI-1402 induit l'expansion des PEryth

Une fois la technique d'expansion des progéniteurs érythroïdes bien maîtrisée, nous avons voulu savoir si le PBI-1402 avait un effet sur la différenciation des cellules CD34⁺ en PEryth. La croissance des PEryth avec le PBI-1402 durant 9 jours ne montre aucune différence significative quant à la prolifération des cellules totales contenues dans le milieu. La présence de PBI-1402 dans le milieu augmente l'acidité de celui-ci, donc la différence légère observée entre les deux courbes pourrait être due à ce phénomène. De façon à déterminer si une mort cellulaire explique la diminution de croissance du nombre de total de cellules, nous avons mesuré l'induction d'apoptose ou de nécrose par marquage au 7-amino actinomycine

A (7AAD) et annexine V en cytométrie en flux. Aucune différence quant à la mort de cellules, soit par apoptose ou nécrose, n'a été observée entre les jours 7 et 10 (Annexe 1). Lorsqu'on regarde spécifiquement le contenu en progéniteurs érythroïdes via la culture sur méthylcellulose, on remarque une augmentation du nombre de CFU-E à partir du jour 7 (jour 7 et 8: $p < 0,05$; jour 9: $p < 0,01$). Toutefois, aucune différence significative n'est obtenue pour les BFU-E. De plus, le nombre de PEryth totaux (BFU-E et CFU-E) est de 2 fois supérieur dans la culture contenant du PBI-1402 (jour 7: 2,75x; jour 8: 2,25x; jour 9: 1,77x). Ces résultats suggèrent donc que le PBI-1402 permet l'expansion préférentielle des PEryth dans une culture de CSH. Ce résultat corrèle avec les résultats obtenus avec le PBI-0049 sur les cellules non sélectionnées obtenues à partir du sang.

Des études récentes ont impliqué la présence des glucocorticoïdes dans le milieu comme un des facteurs responsables de l'expansion des CS en PEryth *in vitro* [155-158], pendant que l'acide rétinoïque, les catécholamines et l'hormone thyroïdienne provoqueraient plutôt la différenciation cellulaire [159-162]. Le maintien de l'homéostasie érythrocytaire est principalement régulé par l'Epo tandis que l'érythropoïèse induite par un stress est coréglée par l'Epo, le SCF et les glucocorticoïdes [127, 163]. Il existe une grande hétérogénéité dans la sensibilité des PEryth aux diverses cytokines. Afin de déterminer comment le PBI-1402, un lipide, réussit à induire l'expansion de PEryth, nous avons voulu investiguer s'il agissait de manière similaire aux glucocorticoïdes et augmentait l'expansion érythrocytaire. La sensibilité des PEryth à l'Epo ou à d'autres cytokines peut être régulée par différents

facteurs incluant la régulation négative par des protéines associées aux récepteurs. Des études ont rapporté que la sensibilité de l'Epo est augmentée dans des cellules où la protéine SOCS-1 [164] ou Lyn [165] est déficiente. D'autres études démontrent que le récepteur du SCF est capable d'activer l'EpoR au stage pré-CFU-E et que cette interaction est essentielle afin que les cellules puissent répondre à l'Epo et terminer leur différenciation [52, 166, 167]. Nous avons donc testé si le PBI-1402 pouvait favoriser la réponse des PEryth à l'Epo ou au SCF. À l'aide d'une courbe dose-réponse, nous avons pu établir que le PBI-1402 n'augmentait pas la sensibilité des PEryth à l'Epo ou au SCF. Le PBI-1402 agit donc comme un facteur extrinsèque capable d'induire la prolifération des PEryth indépendamment de l'Epo ou du SCF. Par contre, il est important de noter la présence d'Epo et de SCF dans le milieu de croissance (favorisant la différenciation érythrocytaire) utilisés pendant les 6 jours de culture qui aurait pu influencer les résultats. La présence des cytokines pourrait avoir eu un effet sur les cellules qui y sont sensibles, les rendant par la suite insensible à l'ajout d'Epo ou de SCF ultérieurement. Le SCF a démontré son efficacité à augmenter l'expansion des progéniteurs primitifs au-delà de la différenciation érythroïde et donc le PBI-1402 pourrait agir en collaboration avec ce genre de cytokines afin d'induire l'expansion de PEryth.

D'après le modèle de la figure 7, le PBI-1402 agirait au niveau des BFU-E et des CFU-E, car son action est localisée essentiellement sur les PEryth. Un effet plus précoce impliquerait une action sur les progéniteurs CFU-GEMM, et on aurait

remarqué une expansion des autres lignées de cellules myéloïdes, ce qui n'est pas le cas.

12 – Mécanisme d'action du PBI-1402

L'efficacité de l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques ne repose pas uniquement sur l'action individuelle des FCH sur les CSH ou sur les progéniteurs hématopoïétiques, mais plutôt sur l'interaction entre les différents facteurs présents. Un bon nombre de facteurs de croissance n'ont qu'un effet d'expansion modéré ou nul alors que leurs effets sont décuplés lorsqu'on les met en présence d'autres facteurs [168]. Des études effectuées sur une variété de FCH ont démontré que la liaison du ligand à son récepteur était capable d'activer une multitude de signaux de transduction comme les Janus kinase (JAK), les STATs, la PI3K et les voies MAPK [57, 62, 166, 169, 170]. Plusieurs évidences ont démontré l'implication de la voie des MAPK lors de l'activation de signaux intracellulaires reconnue comme étant responsables de la prolifération cellulaire [125, 129, 171].

Pour déterminer l'effet du PBI-1402 sur notre culture de PEryth, nous avons préalablement dû sevrer, pendant quatre heures, nos cellules du sérum et des cytokines du milieu afin d'éviter leur interférence. De plus, avant de réaliser nos expériences, nous devons préalablement déterminer les doses efficaces de SCF et d'Epo pour mesurer l'effet du PBI-1402. Des doses d'Epo allant de 0.1 à 25 U/ml ont été testées sur les PEryth. L'utilisation d'une faible dose d'Epo (1 U/ml) pour les expériences subséquentes a été préférée à de plus fortes doses afin d'obtenir une activation tout en s'assurant de pouvoir observer une accentuation du signal (résultats non montrés). Pour le SCF, des doses de 1 à 200 ng/ml ont été testées.

L'utilisation de 10 ng/ml de SCF semblait optimale pour les mêmes raisons que l'Epo. Nous avons aussi testé plusieurs doses de PBI-1402 afin de vérifier si la dose de 0,2 mM de PBI-1402 suggérée par la compagnie était optimale (résultats non montrés)

12.1 – Activation prolongée d'ERK1/2 par le PBI-1402

Les récepteurs de l'Epo et du SCF sont situés dans le même complexe de la membrane plasmique et ils activent des facteurs de signalisation communs comme la voie des MAPK. Une activation synergique des MAPK *in vitro*, provoquée par la combinaison du SCF et de l'Epo, est responsable de l'expansion des PEryth [113]. Bugarski et al ont démontré une activation différentielle de la voie MEK/ERK lors de la prolifération et/ou de la différenciation des progéniteurs BFU-E et CFU-E [172]. D'autres études ont suggéré que l'activation de la voie MEK/ERK était essentielle pour la prolifération érythroïde et avait un rôle négatif pour la différenciation érythroïde et devait être désactivé pour la maturation des érythrocytes [129, 173]. Quoi qu'il en soit, l'activation des ERKs joue un rôle biologique très important et la durée du signal va déterminer la réponse à ce signal. [114, 174]. Il existe de nombreuses études contradictoires quand à l'effet de l'activation transitoire ou prolongée des ERKs. Selon des études sur des cellules neuronales de mammifère, le prolongement de l'activation des ERKs résulte en la différenciation de ces cellules [114] tandis qu'elle amène la prolifération chez les fibroblastes [175-177]. Il a été démontré que l'activation substantielle des ERKs par le SCF et l'Epo était

responsable de la prolifération érythroïde [178]. Donc l'activation du RTK par des FCH et l'activation subséquente des ERKs sont la clé qui va permettre l'activation des facteurs de transcription qui détermineront la conséquence biologique. Il a été démontré que les gènes faisant l'objet d'une régulation positive par le SCF n'interfèrent jamais avec ceux activés par l'Epo et vice versa [127].

Nos résultats démontrent que l'addition de PBI-1402 dans le milieu n'a aucun effet sur l'activation des ERKs. Nous avons testé plusieurs concentrations de PBI-1402 (jusqu'à 1 mM) en obtenant toujours les mêmes résultats négatifs (résultats non présentés). Par contre, comme on s'y attendait, l'ajout de SCF et d'Epo dans le milieu permet l'activation d'ERK1/2 tel que décrit dans la littérature. L'addition de PBI-1402, en plus du SCF et de l'Epo, augmente la phosphorylation d'ERK1/2 et prolonge son activation. Cet effet est dû à l'activation de MEK1/2, son substrat direct, car son inhibition annule les effets du PBI-1402. L'ajout de PBI-1402 au milieu ne contenant que du SCF ou que de l'Epo ne semble pas avoir un effet important, puisque la phosphorylation d'ERK1/2 reste sous le niveau du groupe contenant la combinaison de l'Epo et du SCF. Nous avons aussi testé si des doses plus élevées de SCF et d'Epo pourraient avoir un effet sur la réponse au PBI-1402 (Annexe 2). Nous avons donc utilisé deux combinaisons différentes soient; 25 ng/ml de SCF et 2,5 U/ml d'Epo et 100 ng/ml de SCF et 10 U/ml d'Epo. Les résultats obtenus sont similaires aux résultats précédents utilisant des doses minimales de SCF et d'Epo. Ces résultats confirment que le PBI-1402 accroît l'effet du SCF et de

l'Epo, sans modifier la courbe de sensibilité afin d'induire la prolifération des PEryth.

Les récepteurs des glucocorticoïdes, de l'Epo et du SCF sont essentiels à plusieurs aspects de l'érythropoïèse, car la mutation de leurs gènes cause de nombreux effets phénotypiques allant de l'anémie à la mort in utéro [93, 163]. Plusieurs évidences démontrent que les lipides agissent comme seconds messagers et activent directement les enzymes comme Akt, PI3K et ERK indépendamment de leur cascade de signalisation [179]. Le PBI-1402 qui est aussi un lipide, pourrait agir de manière semblable et aller activer directement ERK1/2 afin de prolonger son activation et permettre aux PEryth de proliférer.

12.2 – Y a-t-il d'autres voies impliquées?

La liaison du SCF et de l'Epo à son récepteur entraîne l'activation de nombreuses cascades de signalisation dont celle de PI3K/Akt, la voie de STAT1, 3 et 5 ainsi que la voie de la PLC [52, 62, 113]. Ces voies de signalisation sont responsables de la survie, de la prolifération et de la différenciation des PEryth.

Nous avons donc vérifié si la présence de PBI-1402 dans le milieu pouvait activer d'autres voies de signalisation, en plus de l'activation prolongée d'ERK1/2, en présence de SCF et d'Epo. D'après nos résultats, la voie des STATs, PI3K et PLC ne sont pas activés par le PBI-1402 (résultats non présentés). Ceci implique que le

PBI-1402 cible des voies à la fois spécifiques et distinctes de l'Epo, rendant cette molécule particulièrement attrayante au plan clinique.

12.3 – Inhibition de la phosphatase MKP-1 par le PBI-1402

Le PBI-1402 prolonge donc l'activation d'ERK1/2. Comme il est décrit plus haut, cette activation prolongée pourrait être due à l'activation directe d'ERK1/2 par le PBI-1402 et être responsable de la prolifération des PEryth. Par contre, d'autres phénomènes pourraient être responsables de cette activité accrue. L'activation des MAPK est un phénomène contrôlé négativement via les phosphatases. L'activation d'ERK1/2 et sa translocation dans le noyau amènent l'activation subséquente de MKP-1 qui va contrôler l'activité d'ERK1/2 et terminer son action au bon moment selon l'intensité du signal voulu. D'importants événements de signalisation intracellulaire sont contrôlés par la balance entre les MAPK et les MAPK phosphatases [180]. Plusieurs facteurs ont la capacité d'inhiber les phosphatases, dont les sels de vanadium ou le cholestérol, et ainsi inhiber la déphosphorylation d'ERK1/2 [128, 181]. Nous avons donc vérifié si le PBI-1402 avait aussi cette capacité à l'inhiber la phosphorylation de MKP-1 suite à l'activation d'ERK1/2. Nos résultats démontrent que le PBI-1402 est capable d'inhiber la phosphorylation d'ERK1/2 pour une période de 30 minutes et ainsi permettre l'activation prolongée d'ERK1/2. De plus, des études ont démontré que l'activation substantielle d'ERK1/2 pourrait être à l'origine de la protéolyse de MKP-1 via la voie d'ubiquitination du protéasome [136, 137].

12.4 – Mécanisme d'action du PBI-1402 sur une culture à long terme

Bien que le PBI-1402 induise l'activation prolongée d'ERK1/2 via l'inhibition de MKP-1, nous ne savons pas si ce phénomène est aussi responsable de l'expansion des PEryth observée en culture. Nous avons donc reproduit ces expériences dans le contexte de notre culture de cellules CD34+ amenées à se différencier en PEryth. Nos résultats indiquent que le PBI-1402 augmente aussi la durée de la phosphorylation d'ERK1/2 et inhibe l'activation de MKP-1. Ceci pourrait expliquer l'augmentation du nombre de CFU-E dans la culture.

13 – Modèle *in vivo*

Suite aux résultats obtenus *in vitro*, l'expérimentation animale s'imposait afin de déterminer s'ils pouvaient être reproduits dans un modèle *in vivo* s'apparentant à l'utilisation clinique. Des souris C57BL/6J ont reçu une dose létale d'irradiation et été greffées le jour même avec de la MO de souris syngéniques. L'irradiation des souris permet d'éliminer toutes cellules qui sont en cycle cellulaire afin de permettre l'étude de l'effet du PBI-1402 sur l'expansion *in vivo* des PEryth murins. Suite à la greffe, les souris ont été gavées, quotidiennement avec du PBI-1402.

Il est important de mentionner qu'aucune expérience sur les cellules de la moelle osseuse de souris n'a été effectuée *in vitro*, tous les résultats proviennent d'expériences *in vivo*. Il serait peut-être intéressant dans le futur d'effectuer ces tests afin de voir si nous obtenons les mêmes résultats *in vitro* que chez l'humain.

13.1 – Amélioration de l'anémie chez les souris traitées au PBI-1402

L'administration quotidienne de PBI-1402 à une dose de 200 mg/kg amène une nette diminution du temps d'apparition de l'anémie et une accélération de la reconstitution érythroïde. Les FCH, comme IL-1, le TNF-alpha, le SCF et IL-12 sont connus pour avoir un effet radioprotecteur sur les progéniteurs de la MO [69, 72]. Il est donc aussi possible que l'administration quotidienne de PBI-1402 permette de

protéger la chute des globules rouges suite à la greffe de MO. Le PBI-1402 aurait donc un effet protecteur sur les PEryth et pourrait ralentir leur mort. Cependant, vu la dose importante de radiation administrée, les PEryth sont appelés à disparaître rapidement. Si ce phénomène est impliqué, il est de courte durée, laissant rapidement la place aux progéniteurs injectées lors de la greffe. S'il existe, l'effet protecteur, en début de traitement, se confond donc par la suite avec l'expansion des PEryth induite par le PBI-1402. Ceci démontre qu'il est donc possible de prévenir l'anémie dans le cadre d'une thérapie intensive avec une médication orale. Afin de déterminer le mécanisme cellulaire expliquant ce phénomène, nous avons mesuré le nombre de progéniteurs érythroïdes présents dans la MO des animaux recevant ou non du PBI-1402.

13.2 – Expansion des PEryth murins par le PBI-1402

Une dose de 3000 U/kg d'Epo permet l'augmentation du nombre de proérythroblastes après 24h chez la souris [182]. Or, les essais clonogéniques, effectués post-transplantation sur nos souris, démontrent que le nombre de BFU-E et CFU-E est augmenté dans la MO des souris traitées au PBI-1402 après seulement 4 jours ($p < 0.05$ à $p < 0.001$). Par contre, contrairement à ce qui est observé pour la lignée érythroïde, le PBI-1402 ne semble avoir aucun effet sur les lignées myéloïdes tant au niveau des progéniteurs qu'au niveau du sang (Annexe 3). Le PBI-1402 permettrait donc une reconstitution érythroïde plus rapide chez les sujets traités que chez le contrôle. Il est intéressant de noter que même si on ne peut observer une

différence pour le nombre de BFU-E chez le groupe traité avec 100 mg/kg de PBI-1402, il y a tout de même une augmentation significative du nombre de CFU-E dans la MO des souris à partir du jour 7 ($p < 0.001$ et $p < 0.01$). La formation des cellules du sang est régulée par les cytokines qui agissent sur les progéniteurs de la MO. Plusieurs cytokines ont l'habileté d'induire sélectivement l'expansion de certains types de lignée ou encore d'agir à un stade spécifique de la différenciation [183, 184]. Différentes explications peuvent être à l'origine de ce phénomène; la sélectivité de la cytokine pour un progéniteur engagé dans une lignée cellulaire précise, la restriction sélective du récepteur sur un type cellulaire ainsi que le signal émis par le récepteur suite à sa liaison sont tous des facteurs qui peuvent influencer l'effet qu'aura une cytokine donnée [185]. Le PBI-1402 pourrait donc agir spécifiquement sur les progéniteurs engagés dans la voie érythroïde et ainsi amplifier leur expansion. D'après nos résultats, le stade de BFU-E en CFU-E serait le plus susceptible au PBI-1402 (Fig. 7).

14 – Conclusion générale

Les transfusions sanguines demeurent de nos jours le traitement le plus utilisé pour pallier l'anémie causée par les traitements anticancéreux ou suite à une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Certaines stratégies expérimentales ayant pour objectif de diminuer ou éliminer les besoins transfusionnels sont fréquemment accompagnées d'effets secondaires non négligeables, comme les infections, l'alloimmunisation ainsi que la résistance aux traitements. De nouvelles approches sont présentement à l'étude afin d'améliorer la qualité de vie des patients et leur permettre de récupérer plus rapidement. On pense par exemple, à l'expansion *ex vivo* des greffons afin d'augmenter le nombre de progéniteurs hématopoïétiques et permettre d'accélérer la reprise des cellules sanguines.

Le PBI-1402 semble très prometteur comme nouvel agent pouvant favoriser l'érythropoïèse. Nous avons pu établir au cours de mon projet que le PBI-1402 permettait l'expansion significative des progéniteurs érythroïdes au stade des BFU-E et CFU-E. Cet effet est dû en majeure partie à l'activation et la prolongation d'un signal mitogène, ERK1/2, et de l'inhibition de sa phosphatase (Fig 7). Ces signaux sont reconnus pour leur rôle dans la prolifération cellulaire, plus particulièrement des progéniteurs érythroïdes. Il est intéressant de noter que les voies habituelles de signalisation activées suite à l'exposition à l'Epo ne sont pas impliquées dans l'expansion induite par le PBI-1402. Ceci suggère que le PBI-1402 agit par des voies distinctes de l'Epo.

De plus, nous avons pu démontrer *in vivo* que le PBI-1402 avait un effet protecteur et permettait de réduire l'anémie et de favoriser la reconstitution érythroïde en induisant l'expansion des progéniteurs dans la moelle osseuse des souris traitées. Ces nouvelles données sont donc très encourageantes.

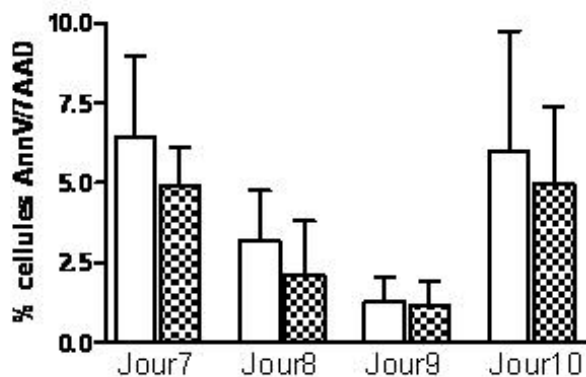
L'ensemble de nos travaux démontre donc tout le potentiel du PBI-1402 comme agent pour le traitement de l'anémie associée ou non à la chimiothérapie. Comme il agit selon des voies différentes de l'Epo, il ne devrait pas être associé aux effets délétaires de ce dernier. De plus, il a l'avantage d'être administré par voie orale. Des études cliniques sont actuellement en cours et démontrent des résultats préliminaires forts intéressants.

ANNEXES

ANNEXE 1

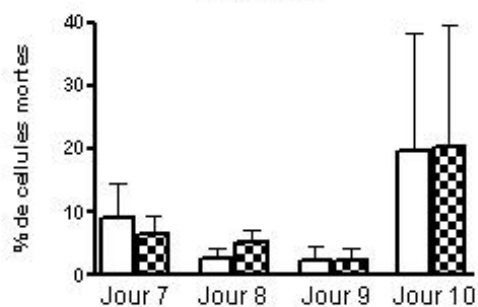
(A)

AnnV7AAD



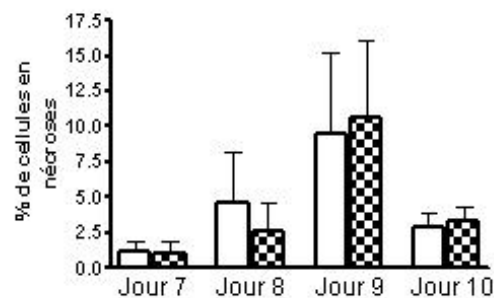
(B)

Annexin V



(C)

7AAD

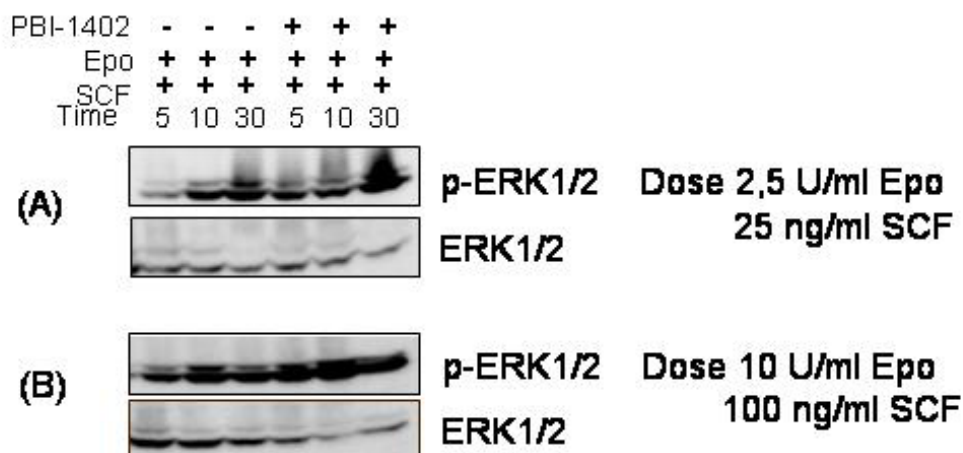


CTRL

 PBI-1402

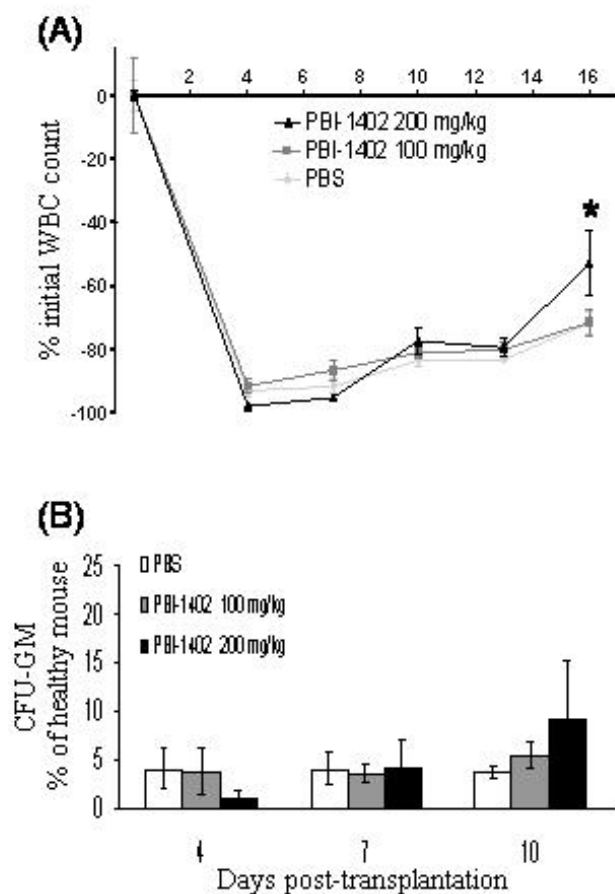
Annexe 1: Les PEryth cultivés en présence ou non de PBI-1402 présentent un profil de mort cellulaire similaire. Les cellules CD34+, cultivées dans le milieu favorisant la différenciation érythroïde en présence ou non de 0.2 mM de PBI-1402, ont été marquées à l'annexin V et le 7-amino actinomycine A (7AAD) à différents jours de culture. (A) Pourcentage des cellules doublement marquées. (B) Pourcentage des cellules en apoptose. (C) Pourcentage des cellules en nécrose. Mean \pm SE, n=3

ANNEXE 2



Annexe 3: La phosphorylation de *Erk1/2* est aussi augmentée chez les PÉryth stimulés au PBI-1402 à des concentrations d'Epo et de SCF très élevées. Les PÉryth ont été sevrés des facteurs de croissance pendant 4h précédant l'expérience puis stimulés avec différentes concentrations d'Epo et de SCF. (A) PÉryth stimulés avec des concentration de 2.5 U/ml d'Epo et 25 ng/ml de SCF. (B) PÉryth stimulés avec des concentration de 10 U/ml d'Epo et 100 ng/ml de SCF. 20 ng de protéines/ puits. n= 5.

ANNEXE 3



Annexe 4: Niveau en globules blancs similaires dans le sang des souris ayant reçu une transplantation de moelle osseuse et qui ont été traitées ou non au PBI-1402. (A) Analyse du pourcentage de globules blancs présents dans le sang des souris traitées ou non au PBI-1402 (B) Décompte du nombre de progéniteurs granulocytaires-macrophages présents dans la moelle osseuse des souris traitées ou non au PBI-1402. Les niveaux sont comparés à ceux d'une souris normale, n'ayant reçu aucun traitement. n=12.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Beaulieu A, Charette S. Annonce des Statistiques canadiennes sur le cancer 2007 - Le cancer menace sérieusement les baby-boomers. Canadian Cancer Society; 2007.
- [2] Howley P, Ganem D, Kieff E. Fundamentals in Oncology, Part I. In: ISNCC, ed. Section 2 Etiology of cancer. Florida: University of Central Florida 2001.
- [3] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414:105-111.
- [4] ehealthMD.com. Anemia. In: ehealthMD.com, ed.: Health Information Publications 2005.
- [5] Savona MR, Silver SM. Erythropoietin-stimulating agents in oncology. *Cancer J*. 2008;14:75-84.
- [6] Rizzo JD, Somerfield MR, Hagerly KL, et al. Use of epoetin and darbepoetin in patients with cancer: 2007 American Society of Clinical Oncology/American Society of Hematology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2008;26:132-149.
- [7] Megalaki C. Erythropoietin in cancer: the new face of an old friend. *J BUON*. 2008;13:7-16.
- [8] Juneja V, Keegan P, Gootenberg JE, et al. Continuing reassessment of the risks of erythropoiesis-stimulating agents in patients with cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14:3242-3247.
- [9] May KA, Khuri FR. Unraveling the mystery of erythropoietin-stimulating agents in cancer promotion. *Cancer Res*. 2008;68:4013-4017.
- [10] Arbuckle RB, Griffith NL, Iacovelli LM, et al. Continued challenges with the use of erythropoiesis-stimulating agents in patients with cancer: perspectives and issues on policy-guided health care. *Pharmacotherapy*. 2008;28:1S-15S.
- [11] Weisdorf DJ. Bone marrow transplantation. What you need to know. *Postgrad Med*. 1990;87:91-101.
- [12] van Bekkum DW. Experimental basis of hematopoietic stem cell transplantation for treatment of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol*. 2002;72:609-620.
- [13] Simpson E, Roopenian D, Goulmy E. Much ado about minor histocompatibility antigens. *Immunol Today*. 1998;19:108-112.
- [14] Fièrè D. Greffes contre le cancer : une découverte majeure permettra d'identifier à l'avance les « donneurs dangereux ». Montreal: Génome Québec; 2007.
- [15] Dall'Amico R, Murer L. Extracorporeal photochemotherapy: a new therapeutic approach for allograft rejection. *Transfus Apher Sci*. 2002;26:197-204.
- [16] Boumedine RS, Roy DC. Elimination of alloreactive T cells using photodynamic therapy. *Cytotherapy*. 2005;7:134-143.
- [17] Saba N, Abraham R, Keating A. Overview of autologous stem cell transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000;36:27-48.
- [18] Direction générale des communications et du marketing Sdsdm. La carte routière technologique de l'industrie pharmaceutique canadienne. In: Canada Gd, ed. Ottawa; 2007.
- [19] Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning

and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14:641-650.

[20] Fauth F, Martin H, Sonnhoff S, et al. Purging of G-CSF-mobilized peripheral autografts in acute leukemia with mafosfamide and amifostine to protect normal progenitor cells. *Bone Marrow Transplant.* 2000;25:831-836.

[21] Capizzi RL, Scheffler BJ, Schein PS. Amifostine-mediated protection of normal bone marrow from cytotoxic chemotherapy. *Cancer.* 1993;72:3495-3501.

[22] Balzarotti M, Grisanti S, Granzow K, et al. Ex vivo manipulation of hematopoietic stem cells for transplantation: the potential role of amifostine. *Semin Oncol.* 1999;26:66-71.

[23] Blogus. Le secret des cellules souches. Neo-sphere blogspot; 2007.

[24] Efremidis AP, Koumakis G, Filis J, et al. Peripheral blood progenitor cell (PBPC) transplantation with a single apheresis in patients with lymphoma, myeloma and solid tumors. *Eur J Haematol.* 1996;57:269-277.

[25] Mahe B, Milpied N, Hermouet S, et al. G-CSF alone mobilizes sufficient peripheral blood CD34+ cells for positive selection in newly diagnosed patients with myeloma. *Br J Haematol.* 1996;92:263-268.

[26] Siena S, Bregni M, Gianni AM. Mobilization of peripheral blood progenitor cells for autografting: chemotherapy and G-CSF or GM-CSF. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 1999;12:27-39.

[27] Eaves C, Miller C, Cashman J, et al. Hematopoietic stem cells: inferences from in vivo assays. *Stem Cells.* 1997;15 Suppl 1:1-5.

[28] Lemischka I. Stem cell dogmas in the genomics era. *Rev Clin Exp Hematol.* 2001;5:15-25.

[29] Binet C. Cellules souches hématopoïétiques : propriétés, description des différents types, schéma de l'hématopoïèse. In: médecine Fd, ed. *Hématopoïèse: CHU et Université de Tours*; 2004.

[30] Schved J. Hématopoïèse, cellules souches et précurseurs hématopoïétiques. In: ADHET, ed.; 2003.

[31] Olsson K. Molecular Medicine and Gene Therapy. In: LundUniversity, ed. *Hematopoietic Stem Cells: Regulation of Self-Renewal and Lineage Choice.* Lund: Stefan Karlsson; 2006.

[32] Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science.* 1996;273:242-245.

[33] Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood.* 1996;87:1-13.

[34] Salati S, Zini R, Bianchi E, et al. Role of CD34 antigen in myeloid differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells.* 2008;26:950-959.

[35] Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:12240-12244.

[36] Bonnet D. Haematopoietic stem cells. *J Pathol.* 2002;197:430-440.

- [37] Morel F, Galy A, Chen B, Szilvassy SJ. Equal distribution of competitive long-term repopulating stem cells in the CD34+ and CD34- fractions of Thy-1lowLin-/lowSca-1+ bone marrow cells. *Exp Hematol.* 1998;26:440-448.
- [38] Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M. Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells. *Exp Hematol.* 1998;26:353-360.
- [39] Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med.* 1998;4:1038-1045.
- [40] Donnelly DS, Zeltermann D, Sharkis S, Krause DS. Functional activity of murine CD34+ and CD34- hematopoietic stem cell populations. *Exp Hematol.* 1999;27:788-796.
- [41] Sato T, Laver JH, Ogawa M. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood.* 1999;94:2548-2554.
- [42] Migliaccio AR, Vannucchi AM, Migliaccio G. Molecular control of erythroid differentiation. *Int J Hematol.* 1996;64:1-29.
- [43] Arcasoy MO, Jiang X. Co-operative signalling mechanisms required for erythroid precursor expansion in response to erythropoietin and stem cell factor. *Br J Haematol.* 2005;130:121-129.
- [44] Sivertsen EA, Hystad ME, Gutzkow KB, et al. PI3K/Akt-dependent Epo-induced signalling and target genes in human early erythroid progenitor cells. *Br J Haematol.* 2006;135:117-128.
- [45] Gulliver G. Observations on the sizes and shapes of red corpuscles of the blood of vertebrates, with drawings of them to a uniform scale, and extended and revised tables of measurements. *Proc Zool Soc London* 1875:474-495.
- [46] Klingmuller U. The role of tyrosine phosphorylation in proliferation and maturation of erythroid progenitor cells--signals emanating from the erythropoietin receptor. *Eur J Biochem.* 1997;249:637-647.
- [47] Palis J. Ontogeny of erythropoiesis. *Curr Opin Hematol.* 2008;15:155-161.
- [48] Tavassoli M, Yoffey JM. Bone marrow, structure and function New York: A.R. Liss; 1983.
- [49] McGrath KE, Koniski AD, Malik J, Palis J. Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. *Blood.* 2003;101:1669-1676.
- [50] Lucitti JL, Jones EA, Huang C, Chen J, Fraser SE, Dickinson ME. Vascular remodeling of the mouse yolk sac requires hemodynamic force. *Development.* 2007;134:3317-3326.
- [51] Emerson SG, Sieff CA, Wang EA, Wong GG, Clark SC, Nathan DG. Purification of fetal hematopoietic progenitors and demonstration of recombinant multipotential colony-stimulating activity. *J Clin Invest.* 1985;76:1286-1290.
- [52] Wu H, Klingmuller U, Acurio A, Hsiao JG, Lodish HF. Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:1806-1810.
- [53] Cheung JO, Casals-Pascual C, Roberts DJ, Watt SM. A small-scale serum-free liquid cell culture model of erythropoiesis to assess the effects of exogenous factors. *J Immunol Methods.* 2007;319:104-117.

- [54] Dorn I, Lazar-Karsten P, Boie S, et al. In vitro proliferation and differentiation of human CD34+ cells from peripheral blood into mature red blood cells with two different cell culture systems. *Transfusion*. 2008.
- [55] Pothet A. Cancer. In: [mecacancer.htm](#), ed.: Acceso; 2006.
- [56] Gregory CJ, Eaves AC. Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses. *Blood*. 1977;49:855-864.
- [57] Richmond TD, Chohan M, Barber DL. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol*. 2005;15:146-155.
- [58] Metcalf D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature*. 1989;339:27-30.
- [59] Kojima S, Matsuyama T, Kodera Y. Hematopoietic growth factors released by marrow stromal cells from patients with aplastic anemia. *Blood*. 1992;79:2256-2261.
- [60] Molineux G, Pojda Z, Hampson IN, Lord BI, Dexter TM. Transplantation potential of peripheral blood stem cells induced by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 1990;76:2153-2158.
- [61] Haas R, Witt B, Mohle R, et al. Sustained long-term hematopoiesis after myeloablative therapy with peripheral blood progenitor cell support. *Blood*. 1995;85:3754-3761.
- [62] Munugalavadla V, Kapur R. Role of c-Kit and erythropoietin receptor in erythropoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005;54:63-75.
- [63] Maslak P, Nimer SD. The efficacy of IL-3, SCF, IL-6, and IL-11 in treating thrombocytopenia. *Semin Hematol*. 1998;35:253-260.
- [64] Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31:1037-1051.
- [65] McNiece IK, Langley KE, Zsebo KM. Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages. *Exp Hematol*. 1991;19:226-231.
- [66] Neben S, Donaldson D, Sieff C, et al. Synergistic effects of interleukin-11 with other growth factors on the expansion of murine hematopoietic progenitors and maintenance of stem cells in liquid culture. *Exp Hematol*. 1994;22:353-359.
- [67] van de Ven C, Ishizawa L, Law P, Cairo MS. IL-11 in combination with SLF and G-CSF or GM-CSF significantly increases expansion of isolated CD34+ cell population from cord blood vs. adult bone marrow. *Exp Hematol*. 1995;23:1289-1295.
- [68] Leary AG, Zeng HQ, Clark SC, Ogawa M. Growth factor requirements for survival in G0 and entry into the cell cycle of primitive human hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:4013-4017.
- [69] Dalmau SR, Freitas CS, Savino W. Radio- and chemoprotection of bone marrow cells by opposite cell cycle-acting cytokines. *Leuk Res*. 1997;21:93-99.
- [70] Briddell RA, Hartley CA, Smith KA, McNiece IK. Recombinant rat stem cell factor synergizes with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in vivo in mice to mobilize peripheral blood progenitor cells that have enhanced repopulating potential. *Blood*. 1993;82:1720-1723.

- [71] Neta R. Modulation with cytokines of radiation injury: suggested mechanisms of action. *Environ Health Perspect.* 1997;105 Suppl 6:1463-1465.
- [72] Maddens S, Charruyer A, Plo I, et al. Kit signaling inhibits the sphingomyelin-ceramide pathway through PLC gamma 1: implication in stem cell factor radioprotective effect. *Blood.* 2002;100:1294-1301.
- [73] Russell ES. Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet.* 1979;20:357-459.
- [74] Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN, et al. Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell.* 1990;63:213-224.
- [75] Muta K, Krantz SB, Bondurant MC, Wickrema A. Distinct roles of erythropoietin, insulin-like growth factor I, and stem cell factor in the development of erythroid progenitor cells. *J Clin Invest.* 1994;94:34-43.
- [76] Carnot P, DeFlandre C. Sur l'activité hémopoïétique de sérum au cours de la régénération du sang. *C R Acad Sci (Paris).* 1906;143:384-386.
- [77] Hjort E. Reticulocyte increase after injection of anemic serum. *Mag F Laegvidensk* 1936;97:270-277.
- [78] Reissmann KR. Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. *Blood.* 1950;5:372-380.
- [79] Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, et al. Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest.* 1988;81:620-623.
- [80] Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ. Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood.* 1988;71:524-527.
- [81] Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003;228:1-14.
- [82] Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell.* 1995;83:59-67.
- [83] Lin CS, Lim SK, D'Agati V, Costantini F. Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev.* 1996;10:154-164.
- [84] Koury MJ, Bondurant MC. Maintenance by erythropoietin of viability and maturation of murine erythroid precursor cells. *J Cell Physiol.* 1988;137:65-74.
- [85] Schmidt EK, Fichelson S, Feller SM. PI3 kinase is important for Ras, MEK and Erk activation of Epo-stimulated human erythroid progenitors. *BMC Biol.* 2004;2:7.
- [86] Johnson DW, Pollock CA, Macdougall IC. Erythropoiesis-stimulating agent hyporesponsiveness. *Nephrology (Carlton).* 2007;12:321-330.
- [87] Jelkmann W, Bohlius J, Hallek M, Sytkowski AJ. The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008;67:39-61.
- [88] Dranoff G, Crawford AD, Sadelain M, et al. Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science.* 1994;264:713-716.

- [89] Stanley E, Lieschke GJ, Grail D, et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:5592-5596.
- [90] Nocka K, Majumder S, Chabot B, et al. Expression of c-kit gene products in known cellular targets of W mutations in normal and W mutant mice--evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes Dev*. 1989;3:816-826.
- [91] Bernstein A, Forrester L, Reith AD, Dubreuil P, Rottapel R. The murine W/c-kit and Steel loci and the control of hematopoiesis. *Semin Hematol*. 1991;28:138-142.
- [92] Kieran MW, Perkins AC, Orkin SH, Zon LI. Thrombopoietin rescues in vitro erythroid colony formation from mouse embryos lacking the erythropoietin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:9126-9131.
- [93] Moliterno A, Spivak JL. Erythropoiesis. In: Anderson KC NP, ed. *Scientific basis of transfusion medicine* 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2000. p. 1-12.
- [94] Brown JE, Adamson JW. Modulation of in vitro erythropoiesis. The influence of beta-adrenergic agonists on erythroid colony formation. *J Clin Invest*. 1977;60:70-77.
- [95] Pace BS, White GL, Dover GJ, Boosalis MS, Faller DV, Perrine SP. Short-chain fatty acid derivatives induce fetal globin expression and erythropoiesis in vivo. *Blood*. 2002;100:4640-4648.
- [96] Castaneda S, Boosalis MS, Emery D, Thies A, Faller DV, Perrine SP. Enhancement of growth and survival and alterations in Bcl-family proteins in beta-thalassemic erythroid progenitors by novel short-chain fatty acid derivatives. *Blood Cells Mol Dis*. 2005;35:217-226.
- [97] Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN. The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol*. 1994;55:1-96.
- [98] Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood*. 1997;90:1345-1364.
- [99] Timokhina I, Kissel H, Stella G, Besmer P. Kit signaling through PI 3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation. *EMBO J*. 1998;17:6250-6262.
- [100] Hong L, Munugalavadla V, Kapur R. c-Kit-mediated overlapping and unique functional and biochemical outcomes via diverse signaling pathways. *Mol Cell Biol*. 2004;24:1401-1410.
- [101] Kimura Y, Jones N, Kluppel M, et al. Targeted mutations of the juxtamembrane tyrosines in the Kit receptor tyrosine kinase selectively affect multiple cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:6015-6020.
- [102] Baker SJ, Rane SG, Reddy EP. Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene*. 2007;26:6724-6737.
- [103] Duensing A. Inhibitors of Pathways Downstream of KIT & PDGFR. In: International GS, ed.: *HONcode*; 2006.
- [104] Lin FK, Suggs S, Lin CH, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82:7580-7584.
- [105] Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*. 1985;313:806-810.

- [106] Fraser JK, Tan AS, Lin FK, Berridge MV. Expression of specific high-affinity binding sites for erythropoietin on rat and mouse megakaryocytes. *Exp Hematol*. 1989;17:10-16.
- [107] Sawyer ST, Krantz SB, Sawada K. Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. *Blood*. 1989;74:103-109.
- [108] Gogusev J, Zhu DL, Herembert T, Ammarguella F, Marche P, Druke T. Effect of erythropoietin on DNA synthesis, proto-oncogene expression and phospholipase C activity in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;199:977-983.
- [109] Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, Levinson R, Steiner M. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:5978-5982.
- [110] Konishi Y, Chui DH, Hirose H, Kunishita T, Tabira T. Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic neurons in vitro and in vivo. *Brain Res*. 1993;609:29-35.
- [111] Masuda S, Nagao M, Takahata K, et al. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem*. 1993;268:11208-11216.
- [112] Spivak JL. The anaemia of cancer: death by a thousand cuts. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:543-555.
- [113] Sui X, Krantz SB, You M, Zhao Z. Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. *Blood*. 1998;92:1142-1149.
- [114] Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 1995;80:179-185.
- [115] Nagata Y, Takahashi N, Davis RJ, Todokoro K. Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood*. 1998;92:1859-1869.
- [116] Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, et al. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*. 1994;369:156-160.
- [117] Derijard B, Hibi M, Wu IH, et al. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*. 1994;76:1025-1037.
- [118] Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*. 1994;265:808-811.
- [119] Rouse J, Cohen P, Trigon S, et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*. 1994;78:1027-1037.
- [120] Grammer TC, Blenis J. Evidence for MEK-independent pathways regulating the prolonged activation of the ERK-MAP kinases. *Oncogene*. 1997;14:1635-1642.
- [121] Ragione FD, Cucciolla V, Criniti V, Indaco S, Borriello A, Zappia V. p21Cip1 gene expression is modulated by Egr1: a novel regulatory mechanism involved in the resveratrol antiproliferative effect. *J Biol Chem*. 2003;278:23360-23368.

- [122] Towatari M, Ciro M, Ottolenghi S, Tsuzuki S, Enver T. Involvement of mitogen-activated protein kinase in the cytokine-regulated phosphorylation of transcription factor GATA-1. *Hematol J*. 2004;5:262-272.
- [123] Bourgin-Hierle C, Gobert-Gosse S, Therier J, Grasset MF, Mouchiroud G. Src-family kinases play an essential role in differentiation signaling downstream of macrophage colony-stimulating factor receptors mediating persistent phosphorylation of phospholipase C-gamma2 and MAP kinases ERK1 and ERK2. *Leukemia*. 2008;22:161-169.
- [124] Sellers LA. Prolonged activation of extracellular signal-regulated kinase by a protein kinase C-dependent and N17Ras-insensitive mechanism mediates the proliferative response of G(i/o)-coupled somatostatin sst(4) receptors. *J Biol Chem*. 1999;274:24280-24288.
- [125] Liebmann C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal*. 2001;13:777-785.
- [126] Misiti J, Spivak JL. Erythropoiesis in vitro. Role of calcium. *J Clin Invest*. 1979;64:1573-1579.
- [127] Kolbus A, Blazquez-Domingo M, Carotta S, et al. Cooperative signaling between cytokine receptors and the glucocorticoid receptor in the expansion of erythroid progenitors: molecular analysis by expression profiling. *Blood*. 2003;102:3136-3146.
- [128] Wang PY, Weng J, Anderson RG. OSBP is a cholesterol-regulated scaffolding protein in control of ERK 1/2 activation. *Science*. 2005;307:1472-1476.
- [129] Kolonics A, Apati A, Janossy J, et al. Activation of Raf/ERK1/2 MAP kinase pathway is involved in GM-CSF-induced proliferation and survival but not in erythropoietin-induced differentiation of TF-1 cells. *Cell Signal*. 2001;13:743-754.
- [130] Uchida M, Kirito K, Shimizu R, Miura Y, Ozawa K, Komatsu N. A functional role of mitogen-activated protein kinases, erk1 and erk2, in the differentiation of a human leukemia cell line, UT-7/GM: a possible key factor for cell fate determination toward erythroid and megakaryocytic lineages. *Int J Hematol*. 2001;73:78-83.
- [131] Morrison DK, Davis RJ. Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003;19:91-118.
- [132] Volmat V, Pouyssegur J. Spatiotemporal regulation of the p42/p44 MAPK pathway. *Biol Cell*. 2001;93:71-79.
- [133] Murphy LO, Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci*. 2006;31:268-275.
- [134] Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*. 2007;26:3203-3213.
- [135] Reffas S, Schlegel W. Compartment-specific regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by ERK-dependent and non-ERK-dependent inductions of MAPK phosphatase (MKP)-3 and MKP-1 in differentiating P19 cells. *Biochem J*. 2000;352 Pt 3:701-708.
- [136] Lin YW, Yang JL. Cooperation of ERK and SCFSkp2 for MKP-1 destruction provides a positive feedback regulation of proliferating signaling. *J Biol Chem*. 2006;281:915-926.

- [137] Lin YW, Chuang SM, Yang JL. ERK1/2 achieves sustained activation by stimulating MAPK phosphatase-1 degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.* 2003;278:21534-21541.
- [138] Gagnon L. PBI-1402, Non Confidential Executive Summary 4. ProMetic BioSciences Inc; 2007. p. 5.
- [139] Rezaei Kalantari H. Surveillance et effets secondaires des transfusions. *Rev Med Liege.* 2002;57:385-388.
- [140] Kendall RG. Erythropoietin. *Clin Lab Haematol.* 2001;23:71-80.
- [141] Del Vecchio L, Pozzoni P, Andrulli S, Locatelli F. Inflammation and resistance to treatment with recombinant human erythropoietin. *J Ren Nutr.* 2005;15:137-141.
- [142] Cortes J, O'Brien S, Loscertales J, et al. Cyclosporin A for the treatment of cytopenia associated with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 2001;92:2016-2022.
- [143] von Lindern M, Schmidt U, Beug H. Control of erythropoiesis by erythropoietin and stem cell factor: a novel role for Bruton's tyrosine kinase. *Cell Cycle.* 2004;3:876-879.
- [144] Knowles DM. *Neoplastic Hematopathology*, Second ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
- [145] Nishinakamura R, Nakayama N, Hirabayashi Y, et al. Mice deficient for the IL-3/GM-CSF/IL-5 beta c receptor exhibit lung pathology and impaired immune response, while beta IL3 receptor-deficient mice are normal. *Immunity.* 1995;2:211-222.
- [146] Fibach E. Techniques for studying stimulation of fetal hemoglobin production in human erythroid cultures. *Hemoglobin.* 1998;22:445-458.
- [147] Fibach E, Manor D, Oppenheim A, Rachmilewitz EA. Proliferation and maturation of human erythroid progenitors in liquid culture. *Blood.* 1989;73:100-103.
- [148] Panzenbock B, Bartunek P, Mapara MY, Zenke M. Growth and differentiation of human stem cell factor/erythropoietin-dependent erythroid progenitor cells in vitro. *Blood.* 1998;92:3658-3668.
- [149] von Lindern M, Zauner W, Mellitzer G, et al. The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro. *Blood.* 1999;94:550-559.
- [150] Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood.* 1992;80:1105-1115.
- [151] Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development. *Blood.* 1987;69:255-263.
- [152] Edelman P, Vinci G, Villeval JL, et al. A monoclonal antibody against an erythrocyte ontogenic antigen identifies fetal and adult erythroid progenitors. *Blood.* 1986;67:56-63.
- [153] Sutherland R, Delia D, Schneider C, Newman R, Kemshead J, Greaves M. Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78:4515-4519.

- [154] Wojda U, Noel P, Miller JL. Fetal and adult hemoglobin production during adult erythropoiesis: coordinate expression correlates with cell proliferation. *Blood*. 2002;99:3005-3013.
- [155] Schroeder C, Gibson L, Nordstrom C, Beug H. The estrogen receptor cooperates with the TGF alpha receptor (c-erbB) in regulation of chicken erythroid progenitor self-renewal. *EMBO J*. 1993;12:951-960.
- [156] Steinlein P, Wessely O, Meyer S, Deiner EM, Hayman MJ, Beug H. Primary, self-renewing erythroid progenitors develop through activation of both tyrosine kinase and steroid hormone receptors. *Curr Biol*. 1995;5:191-204.
- [157] Beug H, Steinlein P, Bartunek P, Hayman MJ. Avian hematopoietic cell culture: in vitro model systems to study oncogenic transformation of hematopoietic cells. *Methods Enzymol*. 1995;254:41-76.
- [158] Wessely O, Deiner EM, Beug H, von Lindern M. The glucocorticoid receptor is a key regulator of the decision between self-renewal and differentiation in erythroid progenitors. *EMBO J*. 1997;16:267-280.
- [159] Zenke M, Munoz A, Sap J, Vennstrom B, Beug H. v-erbA oncogene activation entails the loss of hormone-dependent regulator activity of c-erbA. *Cell*. 1990;61:1035-1049.
- [160] Schroeder C, Gibson L, Zenke M, Beug H. Modulation of normal erythroid differentiation by the endogenous thyroid hormone and retinoic acid receptors: a possible target for v-erbA oncogene action. *Oncogene*. 1992;7:217-227.
- [161] Baretino D, Bugge TH, Bartunek P, et al. Unliganded T3R, but not its oncogenic variant, v-erbA, suppresses RAR-dependent transactivation by titrating out RXR. *EMBO J*. 1993;12:1343-1354.
- [162] Bartunek P, Zenke M. Retinoid X receptor and c-cerbA/thyroid hormone receptor regulate erythroid cell growth and differentiation. *Mol Endocrinol*. 1998;12:1269-1279.
- [163] Bauer A, Tronche F, Wessely O, et al. The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes Dev*. 1999;13:2996-3002.
- [164] Sarna MK, Ingley E, Busfield SJ, et al. Differential regulation of SOCS genes in normal and transformed erythroid cells. *Oncogene*. 2003;22:3221-3230.
- [165] Tong W, Zhang J, Lodish HF. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood*. 2005;105:4604-4612.
- [166] Wu H, Klingmuller U, Besmer P, Lodish HF. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature*. 1995;377:242-246.
- [167] Boer AK, Drayer AL, Vellenga E. Stem cell factor enhances erythropoietin-mediated transactivation of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) via the PKA/CREB pathway. *Exp Hematol*. 2003;31:512-520.
- [168] Giard M-P. Effet d'un extrait plaquettaire sur l'expansion ex vivo de progéniteurs hématopoïétiques. Montréal: Université de Montréal; 2003.
- [169] van Dijk TB, van Den Akker E, Amelsvoort MP, Mano H, Lowenberg B, von Lindern M. Stem cell factor induces phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent Lyn/Tec/Dok-1 complex formation in hematopoietic cells. *Blood*. 2000;96:3406-3413.
- [170] von Lindern M, Deiner EM, Dolznig H, et al. Leukemic transformation of normal murine erythroid progenitors: v- and c-ErbB act through signaling pathways

- activated by the EpoR and c-Kit in stress erythropoiesis. *Oncogene*. 2001;20:3651-3664.
- [171] Anderson DH. Role of lipids in the MAPK signaling pathway. *Prog Lipid Res*. 2006;45:102-119.
- [172] Bugarski D, Krstic A, Mojsilovic S, et al. Signaling pathways implicated in hematopoietic progenitor cell proliferation and differentiation. *Exp Biol Med* (Maywood). 2007;232:156-163.
- [173] Schaefer A, Kosa F, Bittorf T, et al. Opposite effects of inhibitors of mitogen-activated protein kinase pathways on the egr-1 and beta-globin expression in erythropoietin-responsive murine erythroleukemia cells. *Cell Signal*. 2004;16:223-234.
- [174] Dazy S, Damiola F, Parisey N, Beug H, Gandrillon O. The MEK-1/ERKs signalling pathway is differentially involved in the self-renewal of early and late avian erythroid progenitor cells. *Oncogene*. 2003;22:9205-9216.
- [175] Meloche S, Seuwen K, Pages G, Pouyssegur J. Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol Endocrinol*. 1992;6:845-854.
- [176] Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, et al. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science*. 1994;265:966-970.
- [177] Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell*. 1994;77:841-852.
- [178] Erickson-Miller CL, Pelus LM, Lord KA. Signaling induced by erythropoietin and stem cell factor in UT-7/Epo cells: transient versus sustained proliferation. *Stem Cells*. 2000;18:366-373.
- [179] Klingmuller U, Wu H, Hsiao JG, et al. Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:3016-3021.
- [180] Gronda M, Arab S, Iafrate B, Suzuki H, Zanke BW. Hematopoietic protein tyrosine phosphatase suppresses extracellular stimulus-regulated kinase activation. *Mol Cell Biol*. 2001;21:6851-6858.
- [181] Theberge JF, Mehdi MZ, Pandey SK, Srivastava AK. Prolongation of insulin-induced activation of mitogen-activated protein kinases ERK 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase by vanadyl sulfate, a protein tyrosine phosphatase inhibitor. *Arch Biochem Biophys*. 2003;420:9-17.
- [182] Bugelski PJ, Nesspor T, Volk A, et al. Pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin in murine bone marrow. *Pharm Res*. 2008;25:369-378.
- [183] Metcalf D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? *Blood*. 1993;82:3515-3523.
- [184] Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993;81:2844-2853.
- [185] Olweus J, Terstappen LW, Thompson PA, Lund-Johansen F. Expression and function of receptors for stem cell factor and erythropoietin during lineage commitment of human hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1996;88:1594-1607.