

Université de Limoges

ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

Laboratoire PEIRENE EA 7500, Faculté de Pharmacie

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Biologie Cellulaire et Biologie Moléculaire

Présentée et soutenue par

Dima DIAB

**Voies de mort cellulaire et signalisation au cours de
la différenciation mégacaryocytaire de cellules éry-
throleucémiques humaines (HELs)**

Le 22 octobre 2021

Thèse dirigée par Bertrand LIAGRE et Mona DIAB-ASSAF, co-encadrée par David
LÉGER et Rouba HAGE-SLEIMAN

JURY :

Président du jury :

M. Jean-Michel PETIT, Professeur des Universités, Université de Limoges, France

Rapporteurs :

M. Karim BORDJI, IgR-HDR, UMR CNRS 6030-ISTCT, France

M. Philippe BILLIALD, Professeur des Universités, Université Paris-Sud, France

Examineurs :

M. Bertrand LIAGRE, Professeur des Universités, Université de Limoges, France

M. David LÉGER, MCU, Université de Limoges, France

Mme Mona DIAB-ASSAF, Professeur des Universités, Université Libanaise, Liban

Mme Rouba HAGE-SLEIMAN, Associate Professor, Université Libanaise, Liban



JE DÉDIE CETTE THÈSE À MA MÈRE

Because you have so little faith. Truly, I tell you, if you have faith like a grain of mustard seed, you can say to this mountain, 'Move from here to there,' and it will move. Nothing will be impossible for you

-Jesus-



Remerciements

À M. le Professeur Jean-Michel PETIT

Professeur - Université de Limoges - Équipe Glycosylation et Différenciation Cellulaire - PEIRENE EA 7500

À Mme le Professeur Mona DIAB-ASSAF

Professeur - Université Libanaise - Liban

À Mme le Docteur Rouba HAGE-SLEIMAN

Associate professor - Université Libanaise - Liban

À M. le Docteur Karim BORDJI

IgR-HDR - UMR CNRS 6030 - ISTCT - Cyceron

À M. le Professeur Philippe BILLIALD

Professeur de Biochimie - Université Paris-Sud - France

Je tiens tout particulièrement à vous remercier de me faire l'honneur de votre présence dans ce jury et de juger mes travaux de thèse. Je vous exprime, à tous les cinq, ma profonde reconnaissance et tout mon respect.

À M. le Professeur Vincent SOL

Professeur des Universités

Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques - Laboratoire PEIRENE EA 7500 - France

Je tiens à vous remercier de la confiance que vous m'avez accordée pour faire partie de l'équipe de votre laboratoire. Un grand merci à vous de m'avoir donné les moyens de m'épanouir dans mon projet de thèse.

À M. le Professeur Bertrand LIAGRE

Directeur de thèse

Professeur des Universités



Université de Limoges, Faculté de Pharmacie - Laboratoire PEIRENE EA 7500 - France

Je tiens à vous remercier pour votre patience et vos remarques constructives tout au long de mes années de thèse ainsi que vos efforts pour que je puisse soutenir ma thèse.

À M. le Docteur David Yannick LEGER

Co-directeur de thèse

Maître de conférences des universités

Université de Limoges, Faculté de Pharmacie - Laboratoire PEIRENE EA 7500 - France

Je suis reconnaissante envers vous pour avoir été un monteur exigeant, pour avoir instillé en moi le goût de la recherche et pour votre présence ainsi que les conseils mélioratifs.

À Madame Aline PINON

Université de Limoges, Faculté de Pharmacie - Laboratoire PEIRENE EA 7500 - France

Je vous remercie pour votre gentillesse collaborative dès la première année et votre aide durant les expériences. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre écoute active.

Madame Catherine OUK

BISCEM - plateforme technique et bio-informatique - Université de Limoges

Je vous remercie pour votre assistance durant les manips de cytométrie en flux et votre présence durant les analyses.

À Mme le Professeur Mona DIAB-ASSAF

Directrice de thèse

Professeurs des universités

Université Libanaise.



Je tiens à vous remercier pour ma présence sur le sol français et dans ce laboratoire.

À Mes collègues doctorants Lucie et Manuel

Les stagiaires Gaëlle et Fatima, Zahra

La petite margot

Je vous remercie pour les moments conviviaux partagés et les rigolades.

À Magalie, Alice et Christelle

Je vous remercie pour votre présence dans ma vie. Votre présence m'a donné la force malgré que je fusse loin de mes parents. Je vous remercie pour chaque moment avec vos familles et aux quotidiennes.

Je remercie Alice pour ces appels tardifs pour s'assurer que j'ai rentré à la maison après le travail. Je remercie Christelle pour sa tendresse et son amour. Je remercie Magalie pour ses conseils et son attention. Trois femmes incroyables et guerrières. Je vous aime de tout mon cœur.

Afiwa, Daniel

Mes chers amis, je partage avec vous le travail à Burger King et vous êtes devenus une partie de ma vie. Afiwa, tu es une femme forte, attentionnée et belle. Daniel merci pour ton amabilité (Thank you).

Nafisa, Naomie, Ali, Jamal

Merci les amis. Merci pour les promenades et les échanges. On parle de tous les sujets de la vie et on discute sans limite. Jamal thank you for your hospitality and generosity. Love you guys!!!

Chadia, Zeinab,

More than sisters



Dr. Chadia love you darling. Zeinab, the beautiful girl, eating taboulé together was one of my happiest moments. Sharing my life with you is an honor.

Jennifer, Israa, Leena, Nour, Zeina, Hassan, Mohammad

Les libanais à Limoges, merci beaucoup les amies. Each time I need you, I find you, it is an honor.

Wadad

La fille magnifique. Je t'aime beaucoup.
Merci pour tous les promenades et les conseils.

Eve Christophe, Diana

Eve Christophe, Diana, les femmes qui m'ont poussé à sortir ma voix
Je vous remercie.
(Dima Tu pourras conquérir le monde avec ta voix).

Eva, Abigaelle, Sophie

Friends, we sang together, we ate together, we walked together. Your absence today is painful, I miss every moment with you.

Mother, Father, Dalia, Elie, Diab, my uncle Georges

I do not have enough words to thank you,
Mama our life was not easy but there is always a way to find the moon in darkness.
Baba, thank you
Dalia, Elie, Diab, the gang, I miss you so much
This is life. Love you from the bottom of my heart.



All for one, one for all, united we stay, divided we fall.

Four Musketeers



Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Sommaire

Remerciements	3
Droits d'auteurs	8
Sommaire	9
Liste des abréviations	12
Introduction bibliographique.....	19
Chapitre I. Les leucémies	20
I.1. Physiopathologie des leucémies	20
I.2. Les leucémies myéloïdes aiguës (LMA)	21
I.3. Classification	22
I.4. Traitement	26
Chapitre II. La thérapie de différenciation.....	28
II.1. Induction de la différenciation par des molécules chimiques :	28
II.2. Induction de la différenciation par des molécules naturelles :	30
Chapitre III. : La différenciation mégacaryocytaire.....	33
III.1. Définition de la mégacaryocytopoïèse :	33
III.1.1. La polyploïdie :	35
III.1.2. La maturation membranaire :	36
III.2. Les stades de la mégacaryocytopoïèse :	39
III.3. Formation et libération des plaquettes :	42
III.3.1. La formation des plaquettes (maturation cytoplasmique) :	42
III.3.2. La libération des plaquettes :	43
III.4. La régulation de la mégacaryocytopoïèse :	45
III.4.1. Les cytokines :	46
III.4.2. Les facteurs de transcription :	49
Chapitre IV. Apoptose ou mort cellulaire programmée	55
IV.1. Le rôle physiologique de l'apoptose	55
IV.2. Les voies d'induction de l'apoptose :	56



IV.2.1. La voie apoptotique intrinsèque (voie mitochondriale) :.....	56
IV.2.1. La voie apoptotique extrinsèque (voie des récepteurs de mort cellulaire) :	57
IV.2.2. Les caspases :.....	57
IV.2.3. La phase d'exécution de l'apoptose :.....	59
IV.2.4. Interaction entre la voie intrinsèque et extrinsèque d'apoptose :.....	59
IV.3. L'apoptose et la différenciation mégacaryocytaire :.....	60
Chapitre V. L'autophagie	65
V.1. Les différents types de l'autophagie :.....	66
V.1.1. Microautophagie :.....	66
V.1.2. Autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) :.....	66
V.1.3. Autophagie à ADN/ARN (RNAutophagie and DNAutophagie) :.....	67
V.1.4. Macroautophagie :.....	67
V.1.4.1. L'initiation :.....	68
V.1.4.2. L'élongation :.....	69
V.1.4.3. La fusion de l'autophagosome avec le lysosome :.....	71
V.2. La régulation de l'autophagie	73
V.2.1. La voie PI3K/Akt/mTORC1.	74
V.2.2. La voie LKB1/AMPK (LKB1 Liver kinase B1/AMP-activated protein kinase, AMPK).....	75
V.2.3. L'interaction entre Bécline-1 et Bcl-2.	75
V.2.4. NF-κB :.....	77
V.3. Autophagie : le paradoxe différenciation/cancer.	80
V.4. La différenciation mégacaryocytaire et l'autophagie :.....	83
Chapitre VI : Un stéroïde végétal : la diosgénine.....	85
VI.1. Diosgénine	85
VI.2. La différenciation mégacaryocytaire et diosgénine :.....	86
Projet de recherche	90
Matériels et méthodes	92
I. LIGNÉE CELLULAIRE :.....	93
II. TRAITEMENTS :	93



III. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES PROTÉINES PAR WESTERN BLOT :...	94
IV. ANALYSE DE LA QUANTITÉ D'ADN (NIVEAU DE PLOÏDIE) PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX :.....	96
V. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE L'ARNm DE GPV (GLYCOPROTÉINE V), UN MARQUEUR DE DIFFÉRENCIATION MÉGACARYOCYTAIRE.	97
VI. ANALYSE QUALITATIVE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN.....	99
VII. ANALYSE STATISTIQUE.....	100
Résultats.....	101
I. Expression des facteurs clés de l'autophagie pendant la différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL induite par la diosgénine (Dios) 10 µM.	101
II. Effet de la modulation de l'autophagie sur l'expression des facteurs clés de l'autophagie au cours de la différenciation mégacaryocytaire des cellules HELs.	104
III. Effet de la modulation de l'autophagie sur la polyploïdisation caractéristique de la différenciation mégacaryocytaire (maturation nucléaire).	108
IV. Effet de la modulation de l'autophagie sur l'expression génomique de GpV (glycoprotéine V, maturation membranaire)	112
V. Effet de modulation de l'autophagie sur le taux de la fragmentation d'ADN au cours de la différenciation mégacaryocytaire.	114
Discussion	116
Conclusion et perspective.....	122
Table des illustrations.....	125
Table des tableaux	128
Table des matières	129
Publication	132
Références Bibliographiques.....	142



Liste des abréviations

3-MA : 3-méthyladénine

A

APL : leucémie aiguë promyélocytaire

AV : acide valproïque

AraC : cytarabine

ATO : arsenic trioxide

AA : acides aminés

APAF-1 : apoptotic peptidase activating factor 1

AMPK : adenosine monophosphate-activated protein kinase

Akt : protéine kinase B

Atg : autophagy related genes

Ambra 1 : activating molecule in BECN1-regulated Autophagy protein 1

ATCC : American Type Culture Collection

ABTS : 2,2'-azino-di- [3- éthylbenzothiazoline sulfonate]

B

BET : Bromodomain and extra terminal family of protéines

BFU : burst formation unit

bZIP : basic-leucine zipper

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

Bok : Bcl-2 related ovarian killer

Bak : Bcl-2-antagonist/killer 1

BAX : Bcl-2 Associated X

BAD : Bcl-2 Associated Agonist Of Cell Death

BIK : Bcl-2 Interacting Killer

BMF : Bcl-2-Modifying Factor

BIM : Bcl-2-like protein 11

BSA : albumine de sérum bovin

C

CEBPA : CCAAT/enhancer-binding protein alpha

CDKi : cyclin-dependent kinase inhibitors

CFU : colony formation unit



CFU-GEMM : colony forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte

CFU-MK : colony formation unit-megakaryocytes

CD : cluster of differentiation

C-MPL : cellular-myeloproliferative leukemia

CXCR4 : chemokine receptor type 4

CXCL4/PF4 : platelet factor 4

CBF α : core binding protein alpha

c-myb : c-myb avian myeloblastosis viral oncogene homologue

CARD : caspase recruitment domains

CAD : caspase-activated DNase (CAD)

CMA : autophagie médiée par les protéines chaperonnes

CCD : coiled-coil domain

Cdc2 : cell division control protein 2/cyclin-dependent kinase 1

c-AMP : cyclic- adénosine monophosphate

CSC : cellules souches cancéreuses

CQ : chloroquine

CAMKK : calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase

D

DOT1L : Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-79 specific

DMS : demarcation membrane system

DISC : death-inducing signaling complex

DED : death effector domain

Deptor : DEP domain-containing mTOR-interacting protein

DAPK : death-associated protein kinase

Diablo : direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI

Dios : diosgénine

E

ERK : extracellular signal-regulated kinase

EPAC : exchange protein directly activated by cAMP

ECD : evolutionarily conserved domain

EGFR : epidermal growth factor receptor

ETS : E26 transformation specific family



F

FAB : French–American–British classification

FDA : l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux

FISH : fluorescence *in situ* hybridization

FGF : fibroblast growth factor

FOG1 : friend of GATA1

FPD : familial platelet disorder

Fli-1 : friend leukemia virus integration 1

FAS : CD95 (cluster of differentiation 95)

FADD : fas-associated protein with death domain

FIP200 : family interacting protein of 200 kDa

FOXO3 : forkhead box O3

G

Gp : glycoprotéine

GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GAB : growth factor receptor-binding protein 2-associated binder-1

GDP : guanosine diphosphate

GTP : guanosine triphosphate

Grb2: growth factor receptor-bound protein 2

GABARAP : gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein

GEF : guanine nucleotide exchange factors

GAP : GTPase-accelerating proteins

H

HMGB1 : high-mobility group box 1

HSC : cellules souches hématopoïétiques

HDR : hematopoietic domain receptor

HtrA2/omi : high-temperature requirement family A2

HEL : cellule érythroleucémique humaine

H3K4me2 : histone H3 lysine 4 dimethylation

H : heure

I

IL : interleukine

IMS : invaginated membrane system

iPSC : induced pluripotent stem cells



IAP : inhibitor of apoptosis

ICAD : caspase-activated DNase inhibitor

IRS : insulin receptor factor

IKK : I κ B kinase

I κ B- α : nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha

IP : iodure de propidium

J

JAK : janus kinase

JNK : c-Jun N-terminal kinase

J : jour

K

KOR : kaempferol-3-O-rhamnoside

KDM1A : Lysine-specific histone demethylase 1A

L

LMA : leucémie myéloblastique aigüe

LLA : leucémie lymphoblastique aigüe

LMC : leucémie myéloïde chronique

LLC : leucémie lymphoïde chronique

LC3 : light chain 3

LKB1 : liver kinase B1

LAMP : lysosome-associated membrane glycoproteins

M

MPO : myéloperoxidase

MPP : progéniteurs pluripotents

MEP : progéniteurs mégacaryocytaires et érythroblastiques

MAPK : mitogen-activated protein kinases

MYH : myosine

ME : microscopie électronique

MEC : matrice extracellulaire

MYH10 : myosin Heavy Chain 10

MEF2C : myocyte enhancer factor 2C

Maf : musculo-aponeurotic fibrosarcoma



MKL1 : megakaryoblastic leukemia 1

MGG : may-grünwald giemsa

MK : mégacaryocyte

MO : moelle osseuse

Met : metformine

Mcl-1 : myeloid leukemia cell differentiation protein

mTORC1 : mammalian target of rapamycin complex 1

mLST8 : mammalian lethal with SEC13 protein 8

MST1 : mammalian Ste20-like kinase 1

N

NOB : nobilétine

NF- κ B : nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells

O

OMS : organisation mondiale de la santé

P

PMA : phorbol 12-myristate 13-acétate

PKC : protéine kinase C

PML : leucémies promyélocyaires

PMF : polyméthoxyflavone

PLK1 : polo like kinase 1

PCEM : progéniteur commun erythro-myéloïde

PCM : progéniteur commun myéloïde

p21 : cyclin-dependent kinase inhibitor 1A

PUMA : p53 upregulated modulator of apoptosis

PI3P : phosphatidylinositol-3-phosphate

PE : phosphatidyléthanolamine

PLC : phospholipase C

PAS : phagophore assembly site

PRSA40 : proline-rich Akt substrate of 40 kDa

PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase

PI3KC3 : phosphatidylinositol-3-kinase complexe III

PBS : phosphate-buffered saline

PCR : polymrase chain reaction

PVDF : polyfluorure de vinylidène

R



RC : rémission complète
RA : acide rétinoïque
RAR : récepteur à l'acide rétinoïque
RXR : retinoid X receptor
RDE : runt-binding double-strand DNA element
RIP : receptor-interacting protein
RAB : ras oncogene GTPases
Rheb : ras homolog enriched in brain
RAGS : recombination-activating genes
ROCK1 : rho-associated protein kinase 1
ROS : espèces réactives de l'oxygène

S

SRE : serum responsive element
STAT : signal transducer and activator of transcription
SCF : stimulating colony factor
SHP2 : src homology region 2
SHC : src homology 2 domain containing
SOS : son of sevenless
SDF-1 : stromal cell-derived factor 1
SCL : stem cell leukemia
Smac : second mitochondria-derived activator of caspase
STRAD : STE20-related kinase adapter protein alpha
SNARE : soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein Receptor
SEM : erreur type de la moyenne
SVF : sérum de veau foetal

T

TPA : 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate
TPO : thrombopoïétine
TYK : tyrosine kinase
TNF : tumor necrosis factor
TF: facteur de transcription
TAL1: T-cell acute leukemia protein 1
TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand



TRADD : TNFR1-associated death domain protein

TSC1/2 : tuberous sclerosis protein

TAK : transforming growth factor beta-activated kinase 1

TRAF-6 : TNF receptor-associated factor 6

U

ULK : unc-51-like kinase

UVRAG : UV radiation resistance-associated gene protein

UPR : unfolded protein response

V

vWF : von Willebrand factor

VDAC : voltage-dependent anion-selective channel

VPS : vacuolar protein sorting

X

XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis protein

Z

ZFPM1 : zinc finger protein, FOG family member





Chapitre I. Les leucémies

I.1. Physiopathologie des leucémies

Les leucémies sont découvertes pour la première fois par Rodolf Virchow au milieu des années 1800. Virchow a adopté le vocabulaire « white blood » pour décrire cette masse de cellules incolores de taille variable localisées dans les vaisseaux sanguins (1,2). Avec le temps, la physiopathologie des leucémies est devenue plus précise. Les cellules souches hématopoïétiques ou leurs progéniteurs vont se transformer en cellules initiatrices de leucémies suite à des mutations qui déclenchent leur prolifération non contrôlée et leur malignité. L'organisation mondiale de la santé (OMS) classe les différents types de leucémies selon des critères cliniques, morphologiques et cytogénétiques ainsi qu'immunophénotypiques et génétiques-moléculaires (3,4) (**Figure 1**). Il y a quatre grandes catégories de leucémies :

- La leucémie myéloïde aiguë (LMA)
- La leucémie lymphoïde aiguë (LLA)
- La leucémie myéloïde chronique (LMC)
- La leucémie lymphoïde chronique (LLC)

Les leucémies myéloïdes sont induites par des mutations dans les cellules souches hématopoïétiques ou les progéniteurs ce qui les dévie de la voie normale de différenciation qui génère les mégacaryocytes, les érythroblastes, les basophiles, les éosinophiles, les neutrophiles et les monocytes. Il y a deux types de leucémies myéloïdes qui se distinguent par leur degré d'évolution et leur profil génétique :

- Les LMA à évolution rapide
- Les LMC à évolution lente qui pourraient se transformer ou non en LMA (4)

Pour la suite de cette partie, on va aborder en détail les LMAs sur lesquelles notre étude est centrée.



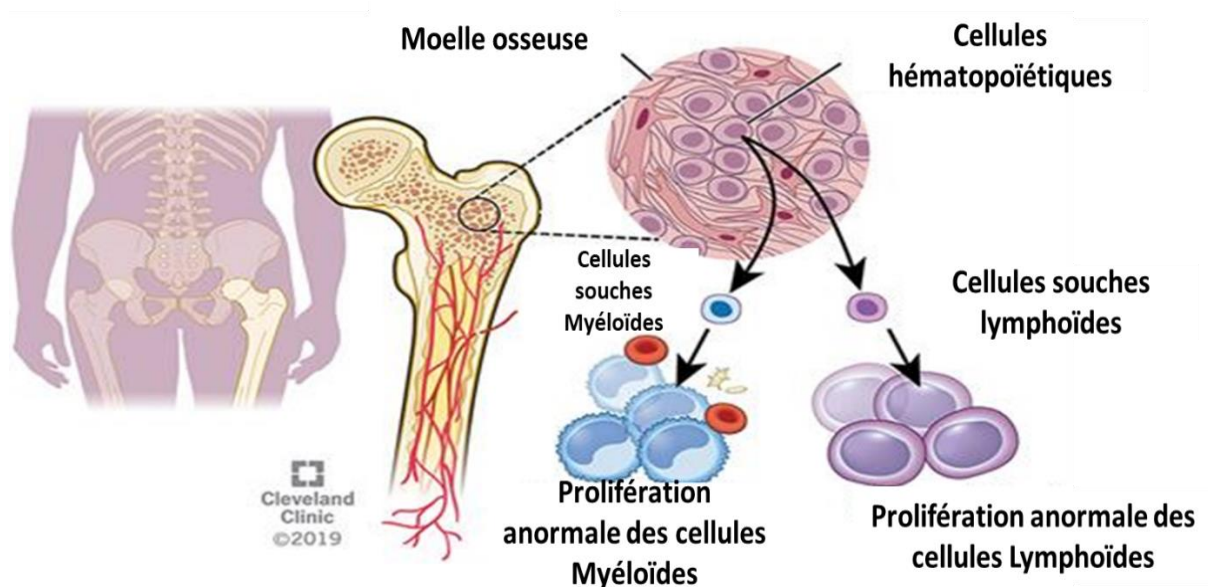


Figure 1 : transformation maligne des cellules souches hématopoïétiques et leurs progéniteurs myéloïdes-lymphoïdes en cellules cancéreuses.

Source : Cleveland Clinic, 2019.

I.2. Les leucémies myéloïdes aiguës (LMA)

Les LMAs se développent suite à l'accumulation des mutations dans les cellules souches hématopoïétiques et/ou leurs progéniteurs qui génèrent les lignées myéloïdes dans la zone médullaire de la moelle osseuse. Ces cellules initiatrices des leucémies vont s'auto-renouveler pour donner une expansion clonale qui envahit la moelle osseuse. Cliniquement pour identifier les leucémies aiguës, le myélogramme doit compter un pourcentage de blastes supérieur à 20%. Les blastes pourraient s'infiltrer par la suite dans les vaisseaux sanguins et la zone extra-médullaire (5). L'incidence de LMA augmente avec l'âge notamment les pics sont observés chez les enfants de moins de 9 ans et les personnes âgées de plus de 65 ans. En général, la fréquence des leucémies constitue 15 à 20% des leucémies aiguës et reste rare par comparaison avec les autres types de cancer (6). La survie et la prolifération des blastes sont maintenues par des mutations et des réarrangements chromosomiques qui sont divisés en trois classes. La classe I affecte la transduction du signal des cellules. Les gènes affectés sont des proto-oncogènes et des suppresseurs de tumeurs qui n'altèrent pas la différenciation tels que la tyrosine-protéine phosphatase PTPN11, le récepteur tyrosine kinase FLT3 et les proto-oncogènes N- et K-RAS, et un transcrit rare de la fusion des gènes BCR/ABL responsable de l'initiation des LMC. La classe II altère la différencia-



tion par exemple le facteur de transcription CEBPA qui module l'expression des gènes codant des protéines responsables de la maturation des cellules granulocytaires. La classe III constituent les mutations des régulateurs épigénétiques (7). Ces mutations pourraient être induites par des rayonnements ionisants, des médicaments anticancéreux (agents alkylants, inhibiteurs de la topoisomérase), des agents chimiques (benzène, tabagisme) ou la présence de maladies hématologiques non malignes (syndromes myélodysplasiques, syndromes myéloprolifératifs, aplasie médullaire. Les facteurs génétiques (la trisomie 21, l'anémie de Fanconi, le syndrome de Bloom, le syndrome de Li-Fraumeni) sont considérés comme un risque élevé pour induire les LMAs. Dans de nombreux cas, les LMAs sont induites comme un effet secondaire du traitement chimiothérapeutique d'un premier cancer (4). Ces mutations sont induites dans les cellules de la lignée myéloïde en différents stades de la différenciation. Cette hétérogénéité crée un profil génétique-moléculaire complexe (5).

I.3. Classification

Historiquement, les classifications des LMAs ont évolué avec la progression des techniques de diagnostic. En 1985, le premier système de classification est établi par le FAB (French-American-British Cooperative Group) (**Tableau 1**). La classification de FAB se base sur les critères morphologiques et cytochimiques. La cytochimie détecte l'activité enzymatique caractéristique dans les blastes notamment l'activité MPO (myéloperoxidase) et d'estérase non spécifique (naphtyle acétate estérase). Apparemment cette classification ne représente et ne caractérise pas tous les types de LMAs. Avec l'hétérogénéité des populations des cellules souches initiatrices, les LMAs sont regroupées dès blastes non différenciés (M0) immatures jusqu'aux leucémies aiguës mégacaryoblastiques différenciées (M7) (4). En 2008, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a fait une mise à jour de la classification ancienne en 1999 des néoplasmes myéloïdes et de leucémies aiguës myéloïdes qui englobe de nouveaux types selon des critères immunophénotypiques, cytogénétiques et génétiques-moléculaires. Cette version de 2008 a suivi une révision en 2016 pour la partie concernant les leucémies myéloïdes aiguës (**Tableau 2**) (3). Les critères cytogénétiques détectent les aberrations chromosomiques (fusions des gènes, translocations) en analysant le caryotype par la technique de FISH (3,4). Les analyses de génétique moléculaire ciblent les mutations et les modifications épigénétiques aux niveaux de l'ADN. Ces techniques ont



permis de détecter la présence de plusieurs anomalies dans un même type de leucémies (6,7). Avec l'âge, l'incidence des leucémies augmente. Le pronostic est beaucoup plus grave chez l'adulte entre 18 et 60 ans que chez l'enfant de moins de 18 ans. Le risque d'apparition des LMAs secondaires est plus grand chez les adultes (17% contre 1% chez les enfants). En revanche, l'apparition *de novo* de LMA ainsi que le taux des anomalies qui touchent le caryotype sont plus élevés chez les enfants (8).

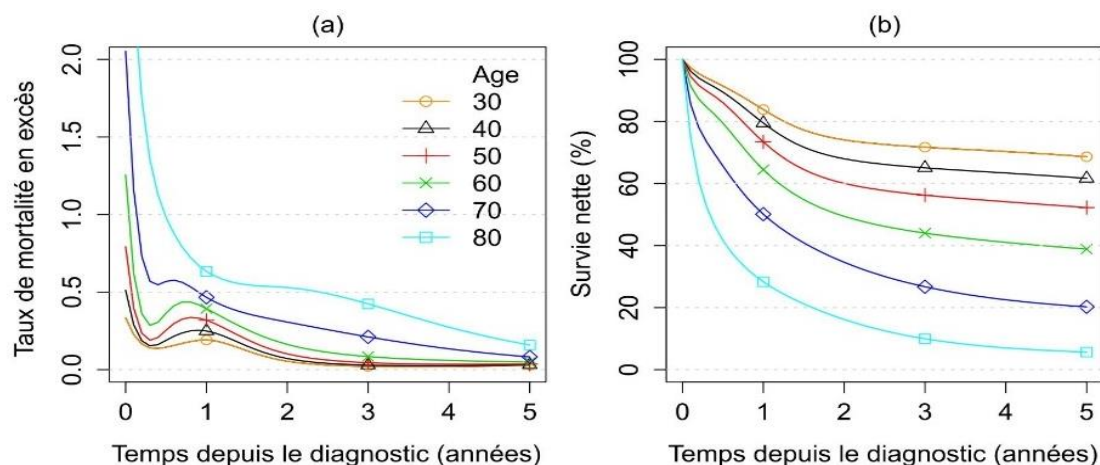


Figure 2 : Taux de mortalité en excès (en nombre de décès par personne-année) (a) et survie nette (b) selon le temps depuis le diagnostic pour différents âges, hommes et femmes ensemble- Leucémies Myéloïdes Aiguës (2010-2015 ; en France Métropolitaine).

Source : Institut National de Cancer, 2020

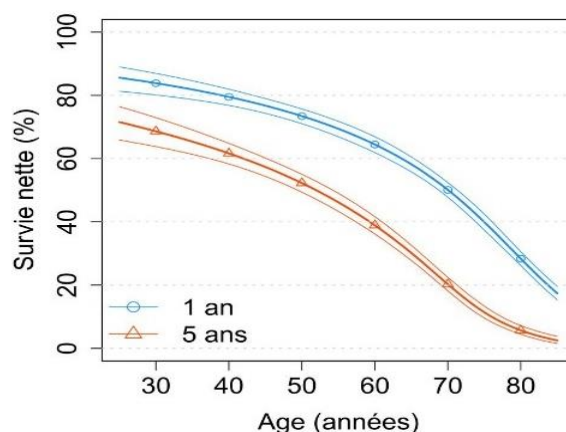


Figure 3 : Survie nette à 1 et 5 ans selon l'âges au diagnostic avec intervalle de confiance à 95%, hommes et femmes ensemble- Leucémies Myéloïdes Aiguës (2010-2015 ; en France Métropolitaine).

Source : Institut National de Cancer, 2020



Tableau 1 : classification des Leucémies Aiguës Myéloïdes (LMA) selon des critères morphologiques et cytochimiques par le FAB (French-American-British Cooperative Group) en 1985.

MPO : myélopéroxydase myéloperoxydase ; EST : esterase estérase non spécifique (naphtyle acétate esteraseestérase) ; PAS (acide periodique-Shiff) (4)

FAB	Morphologie et caractéristiques	Cytochimie			Immuno-phénotype ^{a,b}	Fréquence
		MPO	EST	PAS		
M0	« Leucémie aiguë myéloblastique, peu différenciée », blastes immatures, immunophénotypage nécessaire	< 3 %	–	–	Myéloïde	< 2 %
M1	« Leucémie aiguë myéloblastique sans maturation » Blastes immatures, immunophénotypage nécessaire	3–10 %	–	–		20 %
M2	« Leucémie aiguë myéloblastique avec maturation » 3–20 % de promyélocytes, souvent avec des corps d'Auer Sous-type « M2Baso » : avec basophilie	> 30 %	–	–		30 % < 2 %
M3	« Leucémie aiguë promyélocytaire » (LAP) > 30 % de promyélocytes, corps d'Auer souvent en amas, « fagots »	+++	–	–/+	HLA-DR-	10 %
	Sous-type « M3v » Variante microgranulaire : noyaux lobulés ou réniformes, des corps d'Auer, parfois des granulations azurophiles, morphologie semblable à celle des blastes monocytoides. Analyses cytogénétique et génétique moléculaire nécessaires	++	–	–/+		
M4	« Leucémie aiguë myélomonocytaire ». Semblable à M2, toutefois fraction pro- monocytaire > 20 %	+	+	–		30 %
	Sous-type « M4Eo » : ≤ 30 % d'éosinophiles anormaux (noyaux type monocyte, granules éosinophiles ou basophiles immatures). Analyses cyto-/moléculaire génétiques nécessaires	+	+	+		
M5	« Leucémie aiguë monoblastique » ≥ 80 % des cellules médullaires non érythroïdes sont des cellules à type de monocyte. Sous-type « M5a » monoblastes immatures, monoblastes « M5b » avec maturation, noyau cérébriforme.	+/-	+	–/+		10 %
M6	« Érythroleucémie aiguë » (Di Guglielmo) ≥ 50 % des cellules médullaires nucléées sont des érythroïdes, ≥ 30 % des cellules non érythroïdes sont des blastes	–	–	+/-	Glycophorine+	< 5 %
M7	« Leucémie aiguë mégacaryoblastique » Population de blastes hétérogènes, mégacaryocytes anormaux. Souvent « ponction sèche », immunophénotypage nécessaire dans ce cas	–	–	+/-	CD61 +/ CD41 +	< 5 %



Tableau 2 : classification des LMAs selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2016 (3).

Acute myeloid leukemia (AML) and related neoplasms
AML with recurrent genetic abnormalities
AML with t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
APL with <i>PML-RARA</i>
AML with t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
AML with t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
<i>Provisional entity: AML with BCR-ABL1</i>
AML with mutated <i>NPM1</i>
AML with biallelic mutations of <i>CEBPA</i>
<i>Provisional entity: AML with mutated RUNX1</i>
AML with myelodysplasia-related changes
Therapy-related myeloid neoplasms
AML, NOS
AML with minimal differentiation
AML without maturation
AML with maturation
Acute myelomonocytic leukemia
Acute monoblastic/monocytic leukemia
Pure erythroid leukemia
Acute megakaryoblastic leukemia
Acute basophilic leukemia
Acute panmyelosis with myelofibrosis
Myeloid sarcoma
Myeloid proliferations related to Down syndrome
Transient abnormal myelopoiesis (TAM)
Myeloid leukemia associated with Down syndrome



I.4. Traitement

Les stratégies de traitement des LMAs varient selon les résultats de diagnostics de chaque patient. L'âge et les profils cytogénétiques, cytochimiques et de génétique moléculaire vont déterminer le protocole de traitement. Cliniquement, les phases thérapeutiques commencent par le traitement d'induction. Les patients vont recevoir des cycles de doses élevées d'anthracyclines (daunorubicine, idarubicine, acarubicine) et de cytarabine (AraC). L'induction aboutit à la rémission complète (RC) caractérisée par la normalisation du nombre de cellules leucémiques ou blastes au-dessous de 10^{10} cellules observées par myélogramme. La normalisation sanguine se traduit par la restauration de l'activité normale de la moelle osseuse et l'hématopoïèse normale (4,5,8). Une double induction est possible chez les patients de moins de 60 ans pour assurer une RC (4). Selon les résultats cliniques, l'augmentation de doses d'anthracyclines augmente et accélère la RC. Le taux de survie est de 60-85% chez les patients de moins de 60 ans et de 40-60% chez les patients de 60 ans et plus. En revanche, l'accumulation des doses d'anthracyclines dans l'organisme au-dessus de 300 mg/m² cause une cardiotoxicité tardive très grave principalement chez les enfants et les personnes de plus de 70 ans (5,8). Au terme des résultats de l'induction, une stratification au niveau des types d'anomalies de caryotype sera faite pour les sujets de moins de 65 ans pour définir les protocoles obligatoires de traitement de consolidation. Si les risques sont favorables, la chimiothérapie par dose élevée de cytarabine est appliquée à court-terme pour garantir la RC avec un taux de survie de 50% après 5 ans. Les personnes âgées pourraient éviter ces cycles de chimiothérapie intensive si leurs profils cytogénétiques sont favorables mais ce n'est pas toujours le cas puisque généralement ces sujets ont des pronostics défavorables, des états cliniques altérés, et résistent à la chimiothérapie. Les adultes avec des risques intermédiaires, défavorables ou en seconde rémission, vont passer au traitement d'intensification. Dans ces phases, les allogreffes sont conseillées en tenant compte des faibles probabilités de rechute et l'augmentation de l'espérance de vie des patients sur le long terme. Le désavantage majeur de cette technique est le taux de mortalité élevé. Les sujets âgés de plus de 60 ans ne supportent pas les transplantations de cellules souches hématopoïétiques (TCSH). Les traitements d'entretien avec des doses faibles de cytarabine sont fortement conseillés dans leur cas avec un taux de survie de 15 à 25% (4,5) **(Figure 4).**



Récemment, la thérapie de différenciation est adoptée dans les essais cliniques pour vaincre les effets secondaires des chimiothérapies. Actuellement, des substances naturelles sont en cours de développement comme l'acide valproïque (Depakene® ; Stavzor®), inhibiteur des histones désacétylases (9,10).

Phases thérapeutiques

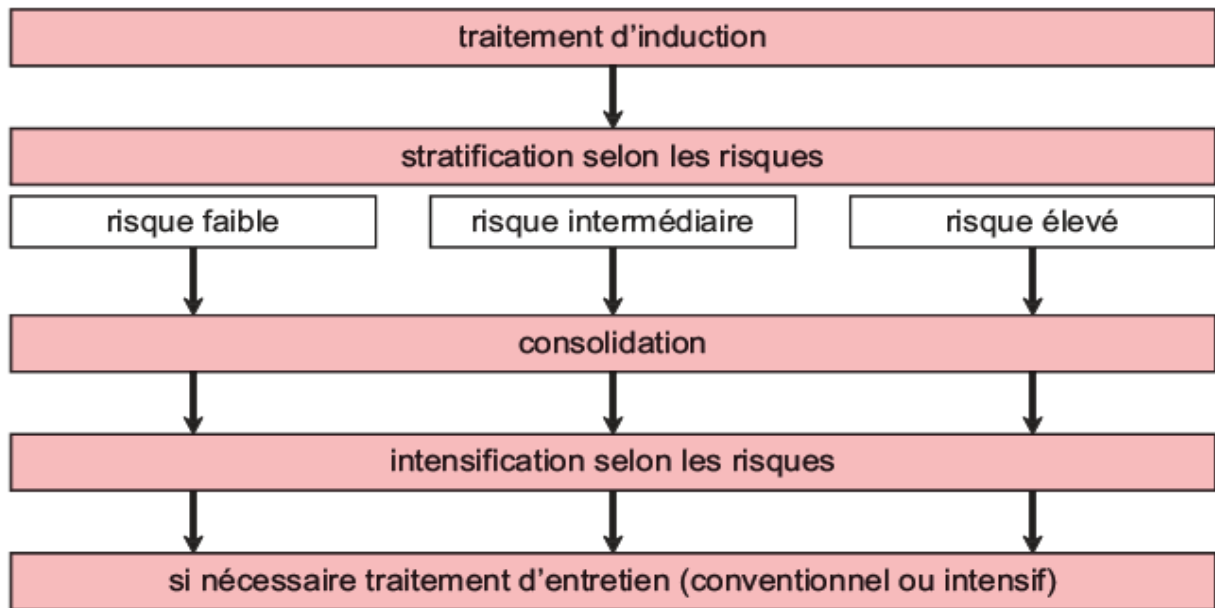


Figure 4 : stratégies de traitement des Leucémies Myéloïdes Aiguës (4).



Chapitre II. La thérapie de différenciation

Selon Weinberg et Hanahan, les cellules cancéreuses sont caractérisées par leur prolifération non contrôlée suite à l'accumulation des mutations et des arrangements chromosomiques. L'hétérogénéité des populations dans la masse tumorale crée une variation de la sensibilité vis-à-vis les agents de chimiothérapie. Cette capacité de résistance contre la mort cellulaire crée des récidives qui développent des cancers plus malins et diminuent l'espérance de vie des patients. La thérapie traditionnelle consiste à induire la mort des cellules par cytotoxicité. La sélectivité des molécules cytotoxiques reste faible car les cellules saines de l'environnement tumoral sont gravement touchées (11).

Actuellement, la thérapie de différenciation est un nouveau concept de traitement qui pourrait pallier la faible efficacité des méthodes traditionnelles en réactivant la différenciation bloquée lors de la transformation des cellules (12). Des substances naturelles ainsi que synthétiques ont montré leurs effets sur un large panel de lignées cancéreuses issues de leucémies (13), de cancer ovarien (14), de glioblastome (15), d'ostéosarcome (16), d'hépatocarcinome (17), de cancer nasopharyngé (18).

Chez les sujets leucémiques le degré de toxicité des organes ainsi que la variabilité des bilans thérapeutiques varient selon leur âge et leur état clinique. Des études fondamentales et des essais cliniques montrent que la combinaison de molécules chimio-thérapeutiques avec des agents différenciants réduit les effets secondaires sur les patients et améliore leurs pronostics sur le long-terme (19).

II.1. Induction de la différenciation par des molécules chimiques :

Bien que la chimiothérapie vise principalement à induire la cytotoxicité cellulaire, une partie de molécules peuvent aussi induire la différenciation des cellules leucémiques. La famille des esters de phorbol (PMA et TPA) (**Figure 5**) est composée d'agents promoteurs de développement tumoral (20). Depuis une trentaine d'années, les travaux de recherche ont découvert la capacité de ces agents à induire la différenciation des lignées leucémiques. En 1991, Lee et al. ont vérifié que le PMA induisait la différenciation monocyttaire ou myélocyttaire des cellules HL-60 en activant la PKC (Protéine Kinase C). Également, le PMA induit la différenciation monocyttaire de la lignée monocytoïde U-937 (21,22). La différenciation mégacaryocytaire des lignées cel-



lulaires K562, Meg-01, et HEL est induite rapidement suite au traitement par le PMA. Les principales voies de signalisation impliquées sont la voie MEK/MAPK/ERK, la voie de l'AMPc et la voie PKC β (23–25). Le 5-azacytidine est un traitement anticancéreux qui inhibe la méthylation de l'ADN. Cette hypo-méthylation des régions promotrices active l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs (26). Le 5-azacytidine est connu pour l'induction de la différenciation des lignées monoblastiques et myéloblastiques aiguës (26,27). Actuellement la combinaison entre cette molécule et la vitamine D3 donne des résultats prometteurs (28). Zebularine est un anticancéreux inhibiteur de méthyle transférase. Le traitement des cellules NB4 (Leucémie Aiguë Promyélocytaire) et KG1 (Leucémies Aiguës Myéloïdes) par la combinaison acide rétinoïque + zebularine renforce la différenciation granulocytaire de ces lignées. Le trioxyde d'arsenic (ATO) (**Figure 5**) induit la différenciation promyélocytaire (29). Des études sur les lignées promyélocytiques HL-60 et NB4 montrent que l'effet de l'ATO seul ou en combinaison avec l'acide rétinoïque renforce et stabilise cette différenciation. L'ATO active le HMGB1 (high-mobility group box 1) responsable de la modification de la conformation de l'ADN pour activer l'expression des gènes de la différenciation cellulaire (30). Une autre étude montre que la combinaison entre le gefitinibe, un inhibiteur du récepteur à l'EGF avec l'ATO sensibilise et accélère la différenciation des cellules APL (Acute Promyélocytic Leukemia), des cellules NB4 en activant la voie ERK (31). Le 3-deazauridine est un inhibiteur de la synthèse de l'ADN. La combinaison entre cette molécule et l'acide rétinoïque induit la différenciation granulocytaire des cellules HL-60 (32). La staurosporine, inhibiteur de la PKC, est un inducteur de l'apoptose. La staurosporine induit également la différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL et K562 via l'activation de la voie JAK/Stat3 (33).

Récemment, l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) a approuvé deux classes de médicaments qui pourraient induire la différenciation chez les sujets leucémiques. La première classe appartient aux inhibiteurs d'IDH1/2 (isocitrate déshydrogénase), une enzyme de cycle de Krebs. Les études cliniques sur les patients de LMA déclarèrent que seulement 11% des patients traités par ivosidenib, inhibiteur d'IDH1/2 muté, ont montré des aspects de la différenciation des blastes. D'un autre côté, la deuxième classe correspond aux inhibiteurs des FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3). C'est un récepteur de tyrosine kinase muté chez 30% des patients de LMA. Deux inhibiteurs de FLT3 muté, gilteritinib and quizartinib,



sont approuvés cliniquement pour leur capacité d'induire la différenciation des blastes LMA.

Dans la phase préclinique, des nombreuses molécules inhibitrices des enzymes épigénétiques sont considérées comme des cibles thérapeutiques potentielles des LMAs. On cite parmi eux : ORY-1001 (inhibiteur de KDM1A), EPZ004777 (inhibiteur de DOT1L) et OTX015 (Bromodomain and extra terminal (BET) family of protéines). Ces molécules ont montré leur capacité d'induire la différenciation des LMA *in vitro* et *in vivo*. Par contre, durant la phase clinique, les résultats sont décevants vu qu'aucune molécule n'a présenté une activité anti-leucémique efficace en monothérapie.

II.2. Induction de la différenciation par des molécules naturelles :

La thérapie conventionnelle induit des nombreux effets indésirables aux sujets leucémiques. L'utilisation des substances naturelles dans la thérapie de différenciation présente un avantage par rapport aux substances synthétiques. L'acide rétinoïque (AR) (**Figure 5**), une substance naturelle dérivée de vitamine A, fait partie des substances les plus utilisées. Ces petites molécules ou leurs analogues vont se fixer sur des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque nommés RAR et RXR. Ces deux récepteurs forment normalement et obligatoirement des hétérodimères qui jouent le rôle de facteurs de transcription. Les gènes régulés par ces protéines sont responsables de la différenciation et de la prolifération cellulaire. 95% des cellules de leucémies promyélocyaires aiguës (APL) sont caractérisées par la translocation réciproque t (15;17) dont le résultat est la fusion de gène de récepteurs des acides rétinoïques avec le gène de corps nucléaires PML (leucémies promyélocyaires) pour donner la protéine de fusion PML-RAR α . La protéine de fusion PML-RAR α est un oncogène qui réprime l'expression des gènes responsables de la mort et la différenciation cellulaires et favorise l'expression des gènes de la prolifération et la survie cellulaires. Le traitement des cellules par de fortes doses d'AR modifie la conformation des récepteurs PML-RAR α , ceci activant la transcription des gènes responsables de la différenciation (34).

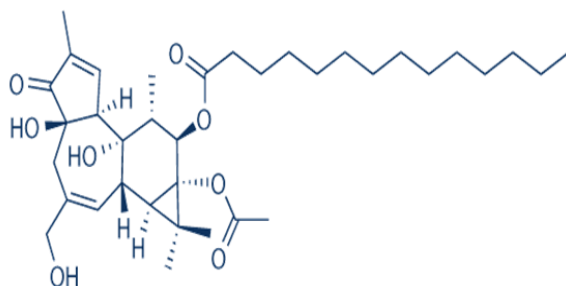
Actuellement, l'AR est inclus dans les phases de traitement des LMAs. Durant l'induction et le traitement de consolidation, la combinaison entre l'AR, la cytarabine et les anthracyclines prolonge la durée de vie des patients, diminue significativement la récurrence et la cytotoxicité de la chimiothérapie, et renforce l'hématopoïèse normale (19)



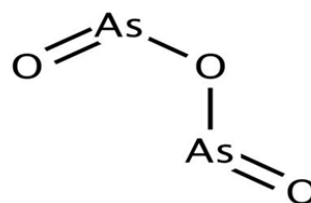
Une autre substance naturelle, l'acide valproïque (AV), inhibiteur des histones désacétylase, est actuellement en étude clinique de phase II. L'AV est un acide gras à chaîne courte. Des études récentes montrent sa capacité d'induire la différenciation mégacaryocytaire de la lignée Meg-01 (lignée mégacaryoblastique) en inhibant les gènes responsables de la différenciation érythrocytaire (35,36). En 2018, Dhenge et al. ont montré l'activation de la voie Notch3 dans les cellules Meg-01 suite au traitement par l'AV (37). La synergie entre AV et l'acide rétinoïque réduit la cytotoxicité et améliore la stabilité et le taux de RC en fonction de la dose de l'AV et la phase d'application (9). La vitamine D₃ avec sa forme physiologique 1 α ,25(OH)₂D₃ joue un rôle très important dans le traitement des LMAs (**Figure 5**) (38). De nombreuses équipes montrent que la 1 α ,25(OH)₂D₃ induit différents types de différenciation myéloïde de plusieurs lignées de LMA telles que HL-60 (leucémies aiguë promyélocytaire) (39,40), NB-4 (leucémies aiguë promyélocytaire) (43), AML-193 (leucémie aiguë monoblastique) (41) et U937 (leucémie aiguë monoblastique) (42). Dans les cellules de LMA, une fois le récepteur de vitamine D₃ activé, il se hétérodimérise avec RXR pour ensuite transloquer au noyau et activer les voies d'apoptose ou de différenciation. Les voies de transduction activées pendant ce processus sont MAPK/ERK, JNK, PI3K/Akt/mTOR et PKC α et β (28,38). Cliniquement, la vitamine D₃ seule ou en combinaison avec des VDAs (analogues de vitamine D), cytarabine (44), interféron- α (45), prednisone (46), AR (34), hydroxyurée (47), thioguanine (44), AV (48), vitamine K (49) et deferasirox (50) améliorent les états cliniques et le taux de survie des patients. Le traitement chronique par la vitamine D₃ induit l'intoxication sous forme de l'hypercalcémie et l'insuffisance rénale aiguë (28,39). Ces effets sont considérés des contraintes à l'utilisation de vitamine D₃ dans le traitement des sujets LMAs. La nobiletine (5,6,7,8,30,40-hexaméthoxyflavone ; NOB), est une polyméthoxyflavone extraite des épluchures d'agrumes. Il est capable d'induire la différenciation mégacaryocytaire des cellules K562 via l'activation de la voie MAPK/ERK (51). En 1998, Kawaii et al. ont confirmé l'induction de la différenciation promyélocytaire des HL-60 par la NOB (52). Une autre molécule naturelle est connue pour son effet anti-inflammatoire et anticancéreux nommée le Kaempferol-3-O-rhamnoside (KOR) extrait des feuilles de *Cyclocarya paliurus*. Selon Yang et al., le traitement des cellules de LMA (HEL) et LMC (K562) par le KOR induit l'augmentation de la polyploïdie et l'expression des récepteurs CD41⁺ et CD61⁺ caractéristiques des mégacaryocytes matures en activant l'axe PKC δ /ERK1/2 (53).



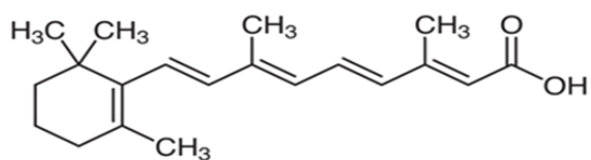
A



B



C



D

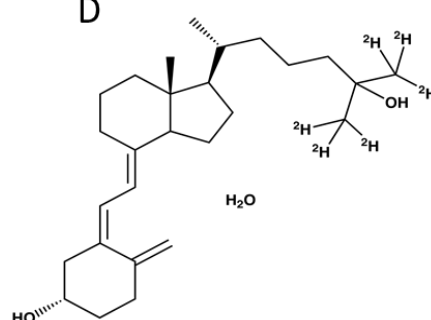


Figure 5 : structure chimique du phorbol myristate acétate (PMA) (A), trioxyde d'arsenic (ATO) (B), acide rétinoïque (AR) (C), vitamine D3 (1 α ,25(OH)2D3) (D).



Chapitre III. : La différenciation mégacaryocytaire

En 1890, Howell a donné la première description des cellules géantes dans la moelle osseuse des chats. Ces cellules marquées par un noyau multilobé sont nommées des mégacaryocytes (54). Après une dizaine d'années, Wright a validé l'hypothèse de Howell sur des sections de moelles osseuses des animaux en appliquant une série des marquages pour conclure que ces cellules jouent un rôle dans l'hématopoïèse. Il a observé l'aspect granuleux de ces cellules avec des extensions filamenteuses de la membrane plasmique nommées des pseudopodes et leurs extrémités ressemblant aux plaquettes (55). Pour continuer les investigations sur le rôle des mégacaryocytes, en 1909, Bunting a démontré qu'il y a une augmentation corrélative du nombre des plaquettes avec la croissance du nombre de mégacaryocytes chez le lapin (56). En 1940, Potter et Ward ont donné une description détaillée des mégacaryocytes murins : ils ont défini le terme de polyploïdie par l'augmentation du contenu en ADN. Ils ont signalé la notion du dernier progéniteur commun myéloïde et lymphoïde (57). En 1956, Thiery et Bessis ont examiné en temps réel la production des plaquettes par des mégacaryocytes par la technique de microcinématographie (58). En 1957, Yamada et al. ont démontré la mise en place du système de la démarcation membranaire et trois stades de la différenciation mégacaryocytaire (59).

III.1. Définition de la mégacaryocytopoïèse :

L'hématopoïèse est le processus de la formation des cellules sanguines de l'organisme principalement au niveau de la moelle osseuse, ceci à partir de deux niches ostéoblastique et vasculaire. Les cellules souches hématopoïétiques se logent dans la niche vasculaire. Ces cellules sont quiescentes, rares et indifférenciées. Lorsque ces cellules sortent de leur état de quiescence, elles s'auto-renouvellent et se divisent symétriquement ou asymétriquement pour maintenir à la fois la niche des progéniteurs et les précurseurs hématopoïétiques pour produire les lymphocytes B, T, granulocytes, monocytes, mégacaryocytes, érythrocytes grâce à leur caractère totipotent. Les progéniteurs multipotents vont se dichotomiser en deux catégories : les progéniteurs communs érythroïdes myéloïdes et les progéniteurs communs lymphoïdes qui sont bipotents. Ces cellules à leur tour vont se différencier en cellules plus matures unipotentes qui sont responsables de la génération des cellules sanguines.



Les progéniteurs myéloïdes communs se divisent en progéniteurs précoces de long terme BFU (Burst Forming Unit) et les progéniteurs tardifs de court terme, CFU (Colony Forming Unit). Ces lignées sont hiérarchisées suite à leur continuelle différenciation en cellules unipotentes. Les progéniteurs tardifs CFU-GEMM (Colony Formation Unit-Granulocyte; Erythrocytes, Monocytes et Megakaryocytes) se différencient en différents types cellulaires tels que les granulocytes, monocytes, mégacaryocytes, myélocytes, érythrocytes (60) (**Figure 6**).

La différenciation mégacaryocytaire est la voie responsable de la formation des plaquettes dans la circulation sanguine de la niche vasculaire. Dans la zone médullaire, les cellules souches CFU-MK (Colony Formation Unit-mégacaryocytes) vont se différencier et donner des mégacaryocytes matures qui vont se fragmenter et libérer des plaquettes dans la circulation sanguine. Les mégacaryocytes sont des cellules géantes avec des diamètres qui varient entre 50-100 µm. La différenciation de ces cellules passe par la maturation nucléaire et membranaire. La maturation nucléaire se traduit par la polyploïdie ou l'endomitose et la maturation membranaire se traduit par l'apparition et l'accroissement de l'expression des récepteurs membranaires caractéristiques nécessaires pour l'interaction de ces cellules géantes avec leur environnement et la libération des plaquettes (61,62).

Pour la suite on va aborder en détail chaque type de maturation nécessaire pour la maturation des mégacaryocytes.

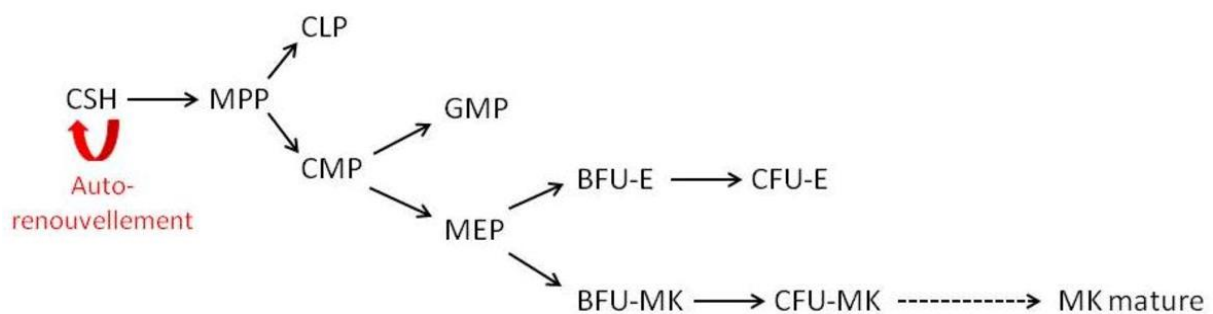


Figure 6 : étapes de la différenciation des CSH en cellules mégacaryocytaires matures.

Les MKs matures sont obtenues après une série de différenciation progressive des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les CSH se différencient progressivement en MPP (progéniteurs pluripotentes), CMP (progéniteurs myéloïdes communs), MEP (progéniteurs mégacaryocytaires et érythroblastiques), BFU-MK (Burst-Forming Unit- mégacaryocytaire), CFU-MK (Colony Forming Unit-mégacaryocytaire) puis en MK matures (63).



III.1.1. La polyploïdie :

La polyploïdie est la multiplication du contenu chromosomique dans les cellules. La quantité d'ADN varie selon la formule $2xN$. Le contenu en ADN peut atteindre 128N et augmente parfois selon le type d'anomalie (64). L'endomitose est le processus durant lequel le contenu en ADN se multiplie. Il se définit par une anomalie de la mitose des cellules provoquant ainsi l'accroissement de la taille des mégacaryocytes jusqu'à la maturation finale (65,66). Des études montrent que l'accomplissement des étapes finales de la mitose est suspendu vu que l'anaphase B, la télophase et la cytokinèse sont absentes dans l'endomitose, ensuite les cellules redémarrent la division suivante en entrant dans la phase G1 de la mitose pour assurer la réplication de l'ADN (67,68). D'autres études récentes ont montré que la mitose était dénuée de cytodierèse. Les cellules entrent éventuellement en télophase et les deux cellules filles se préparent à se séparer après la disparition des fuseaux achromatiques, l'apparition de l'anneau contractile et le sillon de séparation. Éventuellement, les deux cellules filles ne se séparent pas vu que les aspects de la division se disparaissent rapidement induisant le dédoublement de contenu en ADN (64,65,68) (**Figure 7**).

La polyploïdie est un marqueur de la maturation des mégacaryocytes. La teneur de la polyploïdie varie selon l'espèce des mammifères. Chez les oiseaux, la polyploïdie n'accède pas plus de 4N d'ADN mais les cellules accomplissent la maturation (70). Chez l'homme, l'endomitose est indispensable pour la production des métabolites et les protéines nécessaires pour induire la maturation des mégacaryocytes en accélérant l'augmentation de leur taille et le système de la démarcation membranaire (64,71).

Cette étape de transition de mitose en endomitose est régulée par différents types d'effecteurs tels que des cytokines, des facteurs de transcription et des facteurs épigénétiques. Normalement l'étape de la cytodierèse est régulée par différents types de facteurs de transcription qui régulent l'expression des autres protéines effectrices responsables de l'induction de la formation de l'anneau contractile pour séparer les deux cellules filles (63,70-73). Durant la formation de l'anneau contractile, deux systèmes essentiels s'interfèrent : la myosine et l'actine-F. Dans une mitose normale, l'augmentation de l'expression de Rho A induit l'accumulation des myosines II (MYH 9 ; MYH10) et la polymérisation de l'actine-F dans la zone médiane des cellules en cours de différenciation. L'aberration de la mitose finale est maintenue par répression de l'activité de Rho A par l'activation de l'expression de facteur de transcription



RUNX1. Ceci provoque par la suite l'inhibition de l'accumulation des myosines II dans la zone de clivage ainsi que l'inhibition de l'actine-F et engendre la fusion des deux cellules filles capables de dédoubler leur contenu en ADN. (64,65,74-77)

Le cycle cellulaire normal est formé de quatre phases G1, S, G2 et la mitose. La polyploïdie est la conséquence de la régulation de la transition de G1/S et G2/M de façon aussi distinctive. L'expression des cycline D1, D3 et E est relativement élevée lors de la polyploïdie et ne joue pas un rôle lors de la formation des plaquettes (78-82). Les inhibiteurs de kinase cycline-dépendantes (CDKi) responsables du contrôle du cycle cellulaire sont les pivots pour l'endomitose. P21 est une protéine régulant l'homéostasie durant la division cellulaire. Son expression varie pour maintenir une balance entre la progression de la transition G1/S et un haut niveau de polyploïdie (84). En outre, l'expression de p19^{INK4D} est constante pendant l'endomitose et l'inhibition de son niveau basal induit une dérégulation de ce processus, ce qui la différencie de p21^{CIP1/WAF1}(77). Après la réplication de l'ADN, la cycline B1 est un régulateur clé de l'entrée et la sortie de la mitose. La dégradation de cycline B1 par un complexe promoteur de l'anaphase (APC/C) est importante pour réprimer la séparation des cellules filles (68,80,85). Polo Like Kinase 1 (PLK1) est une protéine associée à la maturation des centrosomes, l'initiation de la mitose, la formation des fuseaux mitotiques, la cytodérèse et indispensable pour la polyploïdie (85-87). Suite à son activation par Aurora A, les cellules entrent en mitose. Ensuite, PLK1 à son tour active le kinase cyclin B–Cdk1(kinase dépendante des cyclines dont la sous-unité régulatrice est la cycline B) par le biais du phosphatase Cdc25C (Cell Division Cycle 25C) (89). Une étude faite en 2015, a montré que la délétion de PLK1 dans les megacaryocytes induit une inhibition de l'endomitose. Ils ont montré que l'inhibition de PLK1 active les SAC (point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique) ce qui induit la mort des mégacaryocytes suite à l'arrêt prolongé de la mitose (86).

III.1.2. La maturation membranaire :

Selon le degré de différenciation des cellules souches hématopoïétiques, des marqueurs de surface spécifiques vont s'exprimer pour permettre à ces cellules de s'adapter à leur environnement. Les glycoprotéines de surface sont des marqueurs caractéristiques de chaque type de cellules sanguines. Les cellules souches hématopoïétiques pluripotentes expriment le récepteur CD34⁺. Les lignées myéloïdes sont issues des progéniteurs myéloïdes communs qui vont se différencier hiérarchiquement



en progéniteurs mégacaryocytaires et érythroblastiques bipotents « CFU-EMK » exprimant toujours les récepteurs CD34⁺. Ces cellules vont murir pour donner des progéniteurs mégacaryocytaires immatures (BFU-MK) qui régénèrent plus tard des progéniteurs plus différenciés CFU-MK (89-91). Les cellules promégacaryoblastiques CD41⁺ (glycoprotéine IIb GpIIb) commencent la polyploïdie par la transition du contenu en ADN de 2N à 4N. Les maturations nucléaire et cytoplasmique s'accroissent progressivement. L'augmentation de la taille des cellules et l'apparition consécutive des récepteurs membranaires glycoprotéiques sont importants pour la formation des plaquettes et leurs organelles. Ensuite, CD61 (GpIIIa) s'exprime (93). Plus tardivement, CD42b (GpIb) (91,94), GpIX, GpV, le complexe GpIb-V-IX (ou von Willebrand factor (vWF) (95) et CD36/GpIV progressent consécutivement (96,97) (**Figure 8**). Au fur et à mesure de la maturation des mégacaryocytes, les granules et les membranes de démarcation se développent.



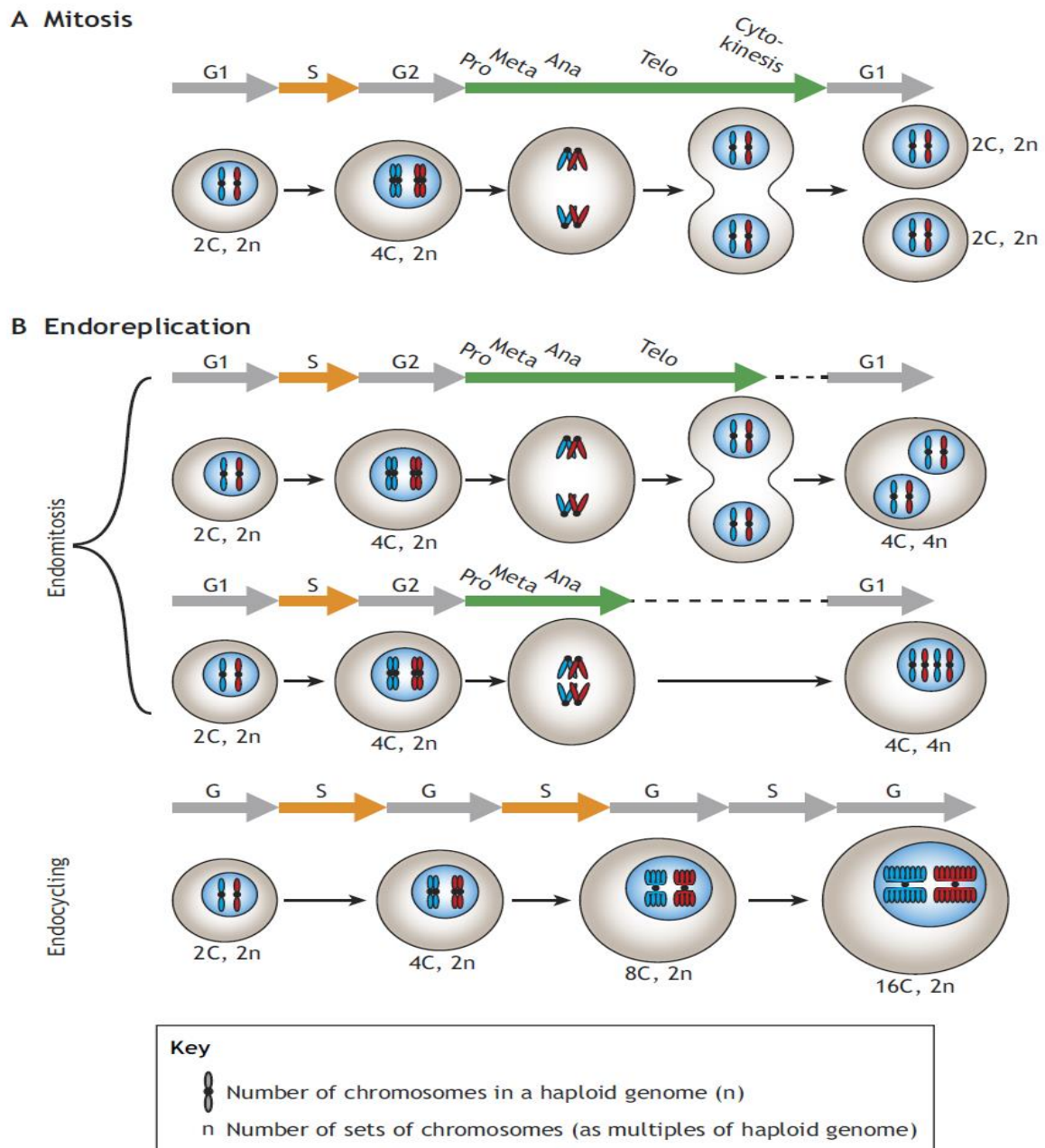


Figure 7 : principe de l'endomitose, dédoublement du contenu en ADN avec la progression de la division cellulaire.

Les phases G1, S et G2 se déroulent normalement, par contre les phases tardives de mitose seront perturbées suite à l'absence du cytotéière. En conséquence, es cellules dédoublent leur contenu en ADN de 2xN après chaque cycle de division (98).



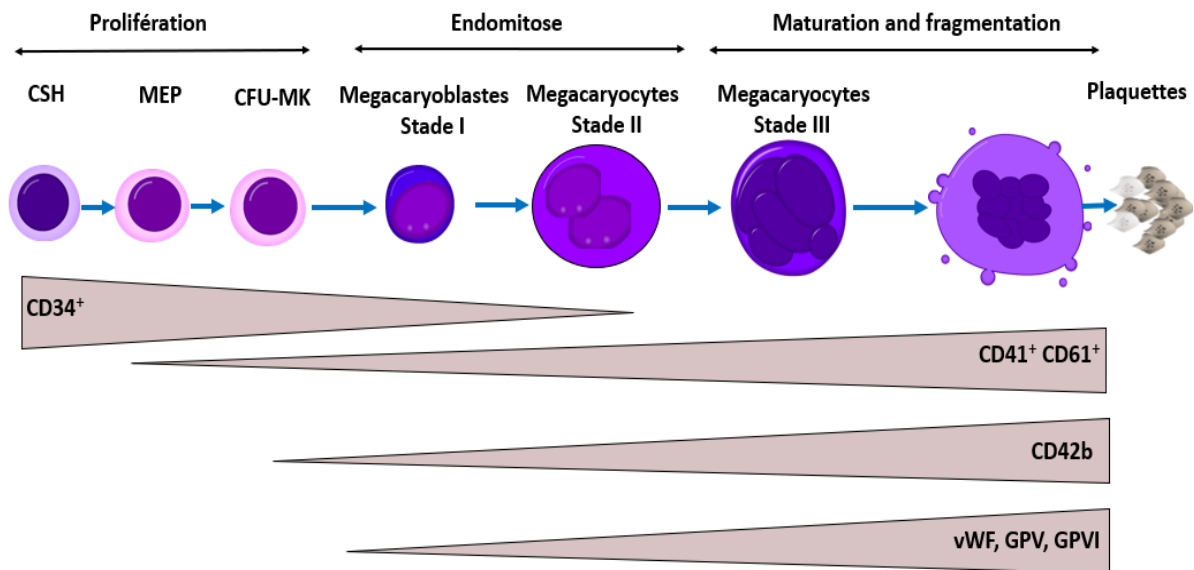


Figure 8 : différenciation mégacaryocytaire et évolution des marqueurs membranaires.

La différenciation mégacaryocytaire s'initie par la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en CFU-MK. Les CFU-MK vont se différencier en mégacaryoblastes (Stade I). Ensuite, les marqueurs de cellules souches immatures ($CD34^+$) diminuent et les cellules caractéristiques des mégacaryocytes commencent à apparaître et à augmenter au fur et à mesure de la différenciation (stades I à III). Les principaux marqueurs sont $CD61^+$, $CD41^+$, $CD42b$, GpV et VI : cela correspond à la maturation membranaire. Après l'augmentation de la taille des mégacaryocytes ayant un noyau multilobé, les cellules génèrent des extensions (proplaquettes) qui vont se fragmenter ultérieurement pour libérer des plaquettes (97).

III.2. Les stades de la mégacaryocytopoïèse :

La différenciation mégacaryocytaire commence dès le stade des promégacaryoblastes. Ces cellules perdent leur aspect prolifératif avec un noyau tétraploïde ($4N$). Ces cellules constituent seulement 10 à 15% de l'ensemble de la lignée mégacaryocytaire. Dans le cytoplasme de ces cellules, on trouve la peroxydase plaquettaire identifiable par microscopie électronique se trouvant être un marqueur de la différenciation mégacaryocytaire.

III.2.1.1. Stade I : mégacaryoblastes :

À ce stade, la taille des cellules augmente suite à l'endomitose qui double la quantité de l'ADN ($2N-8N$). Le rapport nucléo/cytoplasme augmente alternativement à



l'hyperploïdie. Leurs tailles varient entre 20-30 μm avec un noyau bilobé. Par microscopie électronique, on peut apercevoir l'initiation d'un système de protéines spécialisées : les GpIIIa (CD61), GpIb (CD42b), le facteur von Willebrand (vWF), le platelet factor 4 (PF4), et le cluster de différenciation 41/61 (CD41/61, GpIIb-IIIa). À ce stade, la biogénèse des granules α commence (99–102).

III.2.1.2. Stade II : mégacaryocyte basophile :

Ces cellules géantes d'une taille de 40-80 μm ont un rapport nucléo/cytoplasme faible. Par microscopie électronique, on observe un noyau lobulé et une apparition de quelque granules α . La polyploïdie arrive à son terme avec un contenu en ADN à 16N puis la synthèse de l'ADN s'arrête. La coloration de May-Grünwald Giemsa (MGG), montre que le cytoplasme des cellules devient basophile (99–102).

III.2.1.3. Stade III : mégacaryocyte granuleux :

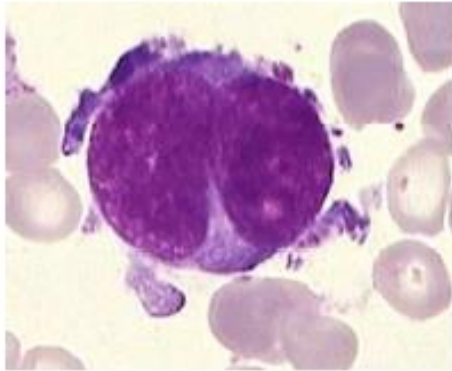
Ces cellules subissent une augmentation de la granulation plaquettaire avec l'installation du système de démarcation de la membrane qui délimite les futures plaquettes. Leurs tailles sont estimées entre 50-100 μm . Elles constituent 55% de l'ensemble de la lignée mégacaryocytaire. Le rapport nucléo/cytoplasmique diminue davantage, le noyau est multilobé et la chromatine est dense. Le cytoplasme est azurophile (riche en granules), perd sa basophilie et devient acidophile (rosé) (99–102).

III.2.1.4. Stade IV : mégacaryocyte mature :

A ce stade, les mégacaryocytes sont nommés plaquettogènes ou matures, de taille 50-120 μm . Le noyau est multilobé ($> 16\text{N}$), pycnotique et dense. Le cytoplasme toujours acidophile et riche en granules et son aspect évoque celui des plaquettes. Les membranes de démarcation s'alignent et s'organisent en tentacules nommées proplaquettes prêtes pour la libération des plaquettes.



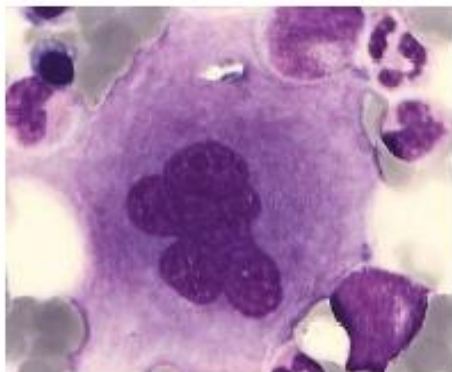
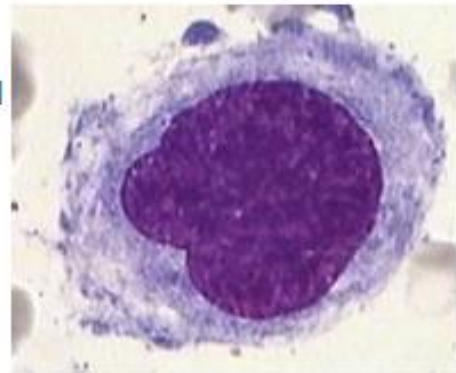
Ultérieurement, les mégacaryocytes prennent l'aspect de noyaux nus entourés par une couche fine de cytoplasme puis sont phagocytés par des macrophages (99–102) (**Figure 9**).



Mégacaryoblaste : ou MK stade I.
La ploïdie augmente (4 – 8 N) et la maturation cytoplasmique débute également.
Sur étalement et coloration au MGG : cellules de 20 à 30 μm de diamètre avec un rapport N/C élevé.
Poursuite des endomitoses.



Mégacaryocyte basophile : ou MK stade II ou promégacaryocyte. A ce stade la ploïdie atteint son apogée et la synthèse d'ADN cesse (la majorité des MK ont une ploïdie = 16N) ; quelques granulations apparaissent.
Diamètre des cellules : 40 – 80 μm



Mégacaryocyte granuleux : ou MK stade III. Les organelles plaquettaires et le système de membranes de démarcation délimitant des territoires plaquettaires commencent à s'organiser.



Mégacaryocyte mature : ou MK stade IV ou plaquettogène ou thrombocytoène. Les granulations se regroupent en petits paquets dans le cytoplasme, ébauches des futures plaquettes : ce stade produit les plaquettes.

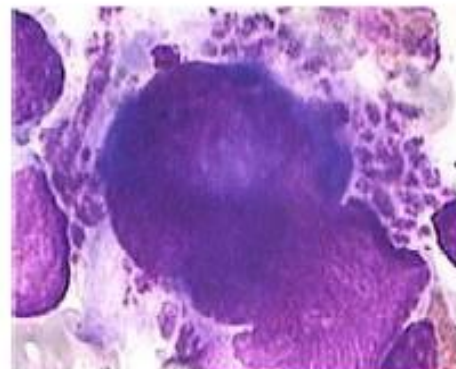


Figure 9 : différentes étapes de la différenciation mégacaryocytaire (99)



III.3. Formation et libération des plaquettes :

III.3.1. La formation des plaquettes (maturation cytoplasmique) :

La formation des plaquettes commence dans les mégacaryocytes en cours de maturation. Les plaquettes sont de petites cellules anucléées de 3 à 5 µm de diamètre. Leur durée de vie est entre 7 à 10 jours après leur libération par les mégacaryocytes. Les plaquettes maintiennent l'homéostasie et l'intégrité de la paroi vasculaire. Elles sont les acteurs de la coagulation sanguine (103,104). Des études récentes montrent que les plaquettes jouent des rôles importants dans le système immunitaire en intervenant contre les infections microbiennes (104), en recrutant et promouvant les cellules de l'immunité innée (106) et en améliorant la réponse immunitaire acquise (107).

La formation des plaquettes se déroule dans les mégacaryocytes. La maturation cytoplasmique des cellules assure la formation des membranes de démarcation. Ces membranes vont définir les futurs territoires plaquettaires. Ce système est caractérisé par l'invagination de la membrane plasmique des mégacaryocytes pour dessiner des ébauches dans le cytoplasme. De nombreuses publications depuis 1957 montrent que la structure de ces membranes est compatible avec la membrane plasmique et celles des futures plaquettes. Dans ces doubles couches lipidiques se trouvent des récepteurs membranaires caractéristiques des cellules anucléées. Les DMS s'étendent dans le cytoplasme et s'interconnectent de manière à constituer un réseau en contact avec le milieu extracellulaire. Ce modèle a été validé *in vitro* (104-106). Plus récemment, d'autres études ont renommé ces membranes par IMS comme système d'invagination membranaire ou système internes des membranes. En 1906, Wright a observé que les mégacaryocytes matures avaient la forme de pieuvre avec des pseudopodes (111). Sa théorie a été validée plus tard par Thiéry et Bessis en 1956. Ils ont pu confirmer que les mégacaryocytes matures donnent des expansions qui s'étendent de plus en plus et libèrent de leurs extrémités des plaquettes (112). Becker et de Bruyn en 1976 ont rapporté la présence de microtubules tout au long de ces extensions. Ces auteurs ont été les premiers à attribuer le terme « proplaquettes » à ces extensions (113,114). Après une dizaine d'années, Leven et Yee ont validé le rôle de la polymérisation des microtubules dans la plaquetto-genèse à partir des mégacaryocytes (115). Une étude en 1982 conduite par Radley et Haller vient vérifier le rôle des microtubules.



Ils ont montré que la dépolymérisation des microtubules altère la formation des proplaquettes (116). Italiano et al. at 1999 ont expliqué en détails la structure des proplaquettes en vérifiant les observations des équipes précédentes ayant décrit la structure des proplaquettes sur des modèles *ex vivo* et *in vitro*. Selon Italiano et al., les proplaquettes sont des extensions à partir du corps des mégacaryocytes matures dont lesquelles se trouvent les microtubules avec une longueur de 2-4 μm . Les membranes de démarcation se dilatent et s'alignent et les organelles des futures plaquettes se dirigent vers les proplaquettes le long des microtubules pour assurer ainsi la libération des plaquettes par leurs extrémités distales après s'être emprisonnés dans cet endroit. La formation de plaquettes induit un changement dans le cytosquelette des mégacaryocytes. La polymérisation des microtubules et l'activation de la myosine et de l'actine sont essentielles pour achever l'extension de ces pseudopodes. Selon les observations par microscopie électronique, la formation des plaquettes commence par une érosion de la périphérie des mégacaryocytes matures. Le cytoplasme se rétrécit et donne alors un réseau interconnecté des proplaquettes dont les branches se ramifient pour produire des plaquettes de différentes tailles. Enfin, les mégacaryocytes prennent la forme d'un noyau nu entouré d'une fine couche de cytoplasme. Des études récentes ont montré que la surexpression de la cytokine SDF-1 et son récepteur CXCR4 sur la surface des mégacaryocytes les aident à migrer à la niche vasculaire pour induire leur maturation à côté des vaisseaux sinusoïdaux. De plus, l'interaction de ces cellules avec la matrice extracellulaire (MEC) de la niche vasculaire est nécessaire pour la maturation et la formation des proplaquettes grâce à des molécules chimiotactiques (103,113-115).

III.3.2. La libération des plaquettes :

De nombreux travaux ont montré que la libération des plaquettes se fait à partir des mégacaryocytes matures. Selon Italiano et al. en 2005, les pseudopodes traversent la paroi des vaisseaux sinusoïdaux. La transformation de la forme des mégacaryocytes matures en forme de pieuvre les aide à s'infiltrer entre les cellules endothéliales. La libération des plaquettes se manifeste dans la circulation sanguine. Le rôle des microtubules est important dans l'extension des proplaquettes. Ces dernières ne sont pas des structures stables. Leurs inclinaisons et leurs ramifications donnent naissance à des « loops » de formes sphériques où les extrémités sont logées. La fusion



de deux extrémités de proplaquettes permet de libérer des préplaquettes qui vont à leur tour se fragmenter pour donner des plaquettes. Des études récentes ont montré qu'à partir de l'interaction avec la MEC de la niche vasculaire, l'interaction entre les molécules sanguines et les récepteurs de surface des mégacaryocytes garantit l'élongation des proplaquettes ainsi que la libération des futures plaquettes (119). En 2007, Junt et al. ont validé le modèle des proplaquettes par le biais des analyses *in vivo* en utilisant la macroscopie multi-photonique intravitale. La même étude a montré que les mégacaryocytes sont incapables de s'infiltrer via les sinusoides en raison de leur taille géante. Par rapport à la capacité d'infiltration de ces vaisseaux, *in vivo*, la même étude a montré la présence de fragments dans la circulation sanguine qui sont 10-100 fois plus grands que les plaquettes. Ce sont les proplaquettes qui vont être libérées par les mégacaryocytes sous l'effet du flux sanguin sinusoidal (120). La libération des plaquettes fait suite à l'apparition d'un fuseau de division au milieu des proplaquettes. En 2011, Thon et al. ont montré la présence d'une forme intermédiaire entre les proplaquettes, les préplaquettes et les plaquettes. Ils ont montré que les clivages successifs des proplaquettes donnent des proplaquettes en forme d'haltère de 30-50 μm et se transforment par la suite en préplaquettes de forme discoïdale de 2-10 μm . Ensuite, ces préplaquettes réversiblement vont s'allonger en proplaquettes suite à la modulation des microtubules et du cytosquelette et la réorganisation des granules- α afin de libérer les plaquettes de leur sommet distal (121). Récemment des études ont montré la présence d'autres sites de production de plaquettes comme le poumon. *In vivo*, Lefrançois et al. ont montré que les mégacaryocytes circulent dans les poumons et libèrent les plaquettes de façon dynamique. Cette production contribue à 50% du nombre total des plaquettes chez les souris. Ils ont montré la présence d'une population de progéniteurs hématopoïétiques ainsi que des mégacaryocytes matures et immatures dans le réseau extravasculaire des poumons. Beaucoup d'aspects concernant la régulation et la production des plaquettes restent à découvrir (122) (**Figure 10**).



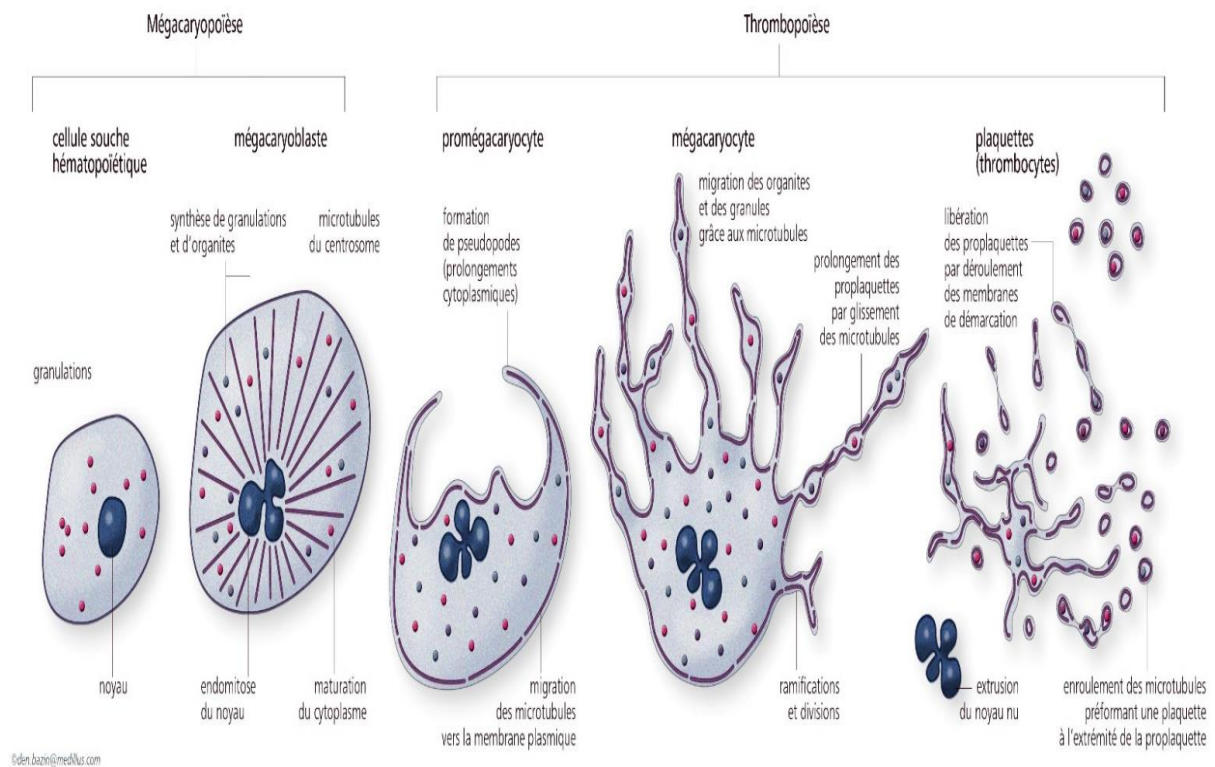


Figure 10 : formation des plaquettes durant la différenciation mégacaryocytaire. La formation de plaquettes nécessite la modulation du cytosquelette des cellules durant la différenciation. Accompagnée par la maturation membranaire et nucléaire, la production des plaquettes commence par la formation de pseudopodes. La modulation des microtubules induit la formation des proplaquettes ainsi que la migration des organites et des granules à l'intérieur de ces structures. La fragmentation des proplaquettes en plaquettes se fait par l'enroulement des microtubules préformant une plaquette à l'extrémité des proplaquettes. (118).

III.4. La régulation de la mégacaryocytopoïèse :

La régulation du processus de mégacaryocytopoïèse commence au niveau de la moelle osseuse (la zone médullaire) où les cellules souches hématopoïétiques vont subir une bifurcation pour donner les différentes lignées cellulaires. Chez l'homme, environ 10^{11} plaquettes sont produites quotidiennement et recyclées tous les 8 à 9 jours (123). Pour inciter les cellules souches de sortir de leur état de quiescence, un ensemble de facteurs de transcription et de cytokines sont exprimés pour permettre à ces cellules de se différencier en mégacaryocytes. Ces facteurs induisent ainsi l'int-



reaction réciproque entre les mégacaryocytes et leur environnement médullaire (MEC de la moelle osseuse) ainsi qu'avec les sinusoides (124,125).

Les cellules souches hématopoïétiques ainsi que les cellules différenciées ont un profil semblable de marqueurs. Ces marqueurs de surface résultent de la transcription des gènes suite à une stimulation du soi ou bien une stimulation micro-environnementale par des cytokines (126,127).

III.4.1. Les cytokines :

Les cytokines jouent des rôles importants dans la modulation de la différenciation mégacaryocytaire. *In vitro* et parfois *in vivo*, le traitement des cellules souches hématopoïétiques ou leurs progéniteurs CFU-MK par l'IL-3, IL-6, IL-1 α , IL-11, SCF (stem cell factor), SDF-1 (stromal derived factor-1), GM-CSF (granulocyte and macrophage colony stimulating factor) et FGF (fibroblaste growth factor) modulent la différenciation mégacaryocytaire. Ces derniers peuvent agir en synergie ou individuellement pour maintenir la maturation des mégacaryocytes ainsi que la libération des plaquettes. Une partie de ces cytokines agit sur la prolifération des colonies des CFU-MK et une autre agit sur l'augmentation de la maturation des mégacaryocytes, la polyploïdie ainsi que la libération des plaquettes (124-128). La synergie entre les cytokines est nécessaire car l'inhibition de l'un de ces facteurs inhibe l'action des autres. Nombreux sont les exemples sur ces sujets, parmi eux on cite la synergie entre IL-1 α et IL-6 qui stimule le changement morphologique des colonies des CFU-MK envers la maturation (128). Il faut mentionner que certaines cytokines (IL-11, IL-3, GM-CSF) possèdent des activités autocrines sur les mégacaryocytes ainsi qu'elles poussent ces derniers à produire des facteurs de croissance nécessaires pour la maturation, la formation et la libération des plaquettes (129-131) **(Figure 11)**.

SCF (Stem Cell Factor) nommé encore « le ligand kit » est produit par les fibroblastes du stroma au niveau de la moelle osseuse. Cette protéine possède une activité tyrosine kinase et peut exister sous forme soluble dans le stroma médullaire ou adhérer à la membrane des cellules. Plusieurs études ont montré que des souris déficientes en SCF présente une diminution du nombre de mégacaryocytes tout en conservant un nombre, une taille et une production normale de plaquettes (129,136) **(Figure 11)**.

La cytokine la plus importante physiologiquement est la TPO (thrombopoïétine). Une expérience réalisée par Gainsford et al. en 2000 a montré que les souris défi-



cientes de c-MPL (cellular Myeloproliferative Leukemia), le recepteur de la TPO, induit une forte thrombocytopénie sans perte totale de la synthèse de plaquettes. De plus, la perte additionnelle d'IL-3, IL-6, IL11 et LIF (Leukemia Inhibitory Factor) n'a pas pu corriger cette thrombocytopénie (137). Ceci montre que ces cytokines ne sont pas essentielles dans le processus de libération des plaquettes.

La TPO est une hormone appartenant à la famille des cytokines de 36 kDa de poids moléculaire qui atteint 94 kDa après sa glycosylation. La TPO est produite dans le foie suite à la diminution du nombre de plaquettes dans le sang. Ensuite, cette hormone circule dans le sang pour arriver à la zone médullaire (136–138). Le terme TPO a été découvert la première fois en 1958 comme étant la substance humorale responsable de la production de plaquettes. C'est l'unique cytokine qui est capable de réguler tous les stades de la production des mégacaryocytes (138–141). Une étude réalisée par Murone et al. sur des souris a montré que la délétion "knock-out" du gène codant pour la TPO induit une chute de la production de plaquettes de 90% de même sur le nombre des mégacaryocytes (142). D'autres études confirment que la TPO en synergie avec le SCF, l'IL-11 et l'EPO (érythropoïétine) est responsable de la régulation de la survie et l'expansion des CSH (cellules souches hématopoïétiques) (143–146). En outre, la TPO induit la maturation membranaire et cytoplasmique des mégacaryocytes en stimulant la polyploïdie *in vivo* ainsi qu'*in vitro* sur des lignées cellulaires pro-mégacaryocytaire (147,148). En ce qui concerne la production des plaquettes, des études ont montré que la TPO est cruciale pour la formation des membranes de démarcation (123). L'exécution de l'activité de la TPO se fait par le biais de c-MPL, son récepteur membranaire. En 1992, la caractérisation de c-MPL a conduit au clonage de la TPO (149). Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs de cytokines de type I (récepteurs de cytokines hématopoïétiques), la masse moléculaire variant entre 85 et 92 kDa. En 1990, c-MPL est identifié la première fois comme le proto-oncogène homologue de l'oncogène v-MPL du « Myéloproliférative Leukemia Virus » responsable du syndrome myéloprolifératif chez les souris. c-MPL est un récepteur orphelin qui est formé de trois parties : intracellulaire, transmembranaire et extracellulaire (149). La partie extracellulaire de 466 acides aminés fixe la TPO (c-MPL ligand) via le domaine HDR (Hematopoietic Domain Receptor). La partie transmembranaire est responsable du maintien de c-MPL à l'état de monomère inactif sans la présence de TPO. La partie intracellulaire du récepteur est responsable du déclenchement de la transduction de signal suite à son activation (149). L'expression de ce récepteur est majoritairement



retrouvé dans les CSH (150), les mégacaryocytes et les plaquettes (151) et les cellules endothéliales (152). La fixation de TPO sur c-MPL induit sa dimérisation. Le domaine intracellulaire cytoplasmique est hautement non structuré et ne possède pas une activité catalytique mais il permet de fixer les partenaires moléculaires JAK2 et TYK2. JAK2 est le seul qui est actif. Après son autophosphorylation, il phosphoryle les résidus tyrosine de c-MPL ainsi que les autres protéines transductrices du signal et indispensables pour maintenir la niche des CSH, les mégacaryocytes et leurs progéniteurs. Ces protéines sont les facteurs de transcription STAT 1, 3 et 5, PI3K/Akt et les MAPKs (144,153) (**Figure 11**).

L'orientation des cellules vers la différenciation se fait suite à la formation d'un complexe composé de SHP2 qui recrute la protéine Gab/IRS et p85 (l'unité régulatrice de PI3K). Ce complexe active PI3K et Akt, induit la survie et la stimulation de la maturation (154,155). D'un autre côté, la TPO active la voie des MAP kinases p38 (156) et p44/42 (ERK1 et ERK2) (157). Cette activation est induite par le recrutement et la phosphorylation de Grb2, SHC, SOS au niveau du récepteur actif. Ces protéines activent Ras en échangeant le GDP par du GTP (158). Beaucoup d'études sur p38 ont montré son rôle dans l'expansion clonale des CSH (156). Néanmoins, le rôle de ERK1/2 a bien été confirmé dans la mégacaryocytopoïèse assurant une bonne prolifération et polyploïdisation des mégacaryocytes (159). TPO joue un rôle dans l'activation et l'agrégation des plaquettes. Selon Van Willigen et al, TPO augmente la sensibilité des plaquettes à alpha thrombine. Suite à la fixation de α -thrombine sur son récepteur plaquettaire, l'axe PKC-ERK1/2 est activé. ERK1/2 à son tour stimule l'activité de phospholipase A2 (PLA2), enzyme responsable de la libération de l'acide arachidonique à partir des glycérophospholipides. Ce dernier induit l'agrégation des plaquettes en activant le thromboxane B2.(160). Il faut mentionner que c-MPL sur les cellules endothéliales ne joue pas un rôle dans la formation des plaquettes (152) (**Figure 11**).

SDF-1 (stromal derivative factor-1) est une chimiokine sécrétée par les cellules stromales de la moelle osseuse. Ces chimiokines sont capables d'induire la rétention des CSH au niveau moelle osseuse lors du développement fœtal (156-159). SDF-1 (CXCL12) assure la migration des mégacaryocytes immatures et leurs interactions avec les vaisseaux endothéliaux (sinusoïdes) dans l'environnement de la moelle osseuse de façon intégrine $\alpha 4 \beta 1$ dépendante (160-163). Les récepteurs CXCR4 de SDF-1 sont exprimés sur la surface des progéniteurs des mégacaryocytes, des mégacaryo-



cytes matures ainsi que sur les plaquettes (166,169). Lane et al. en 2000 ont montré que la production des plaquettes se fait durant la migration transendothéliale des mégacaryocytes CXCR4⁺ (170). La fixation de SDF-1 sur son récepteur induit l'activation des voies ERK1/2, MEK et Akt afin de réguler la différenciation et la prolifération des progéniteurs (171) (**Figure 11**).

PF4, nommée encore CXCL4, est une cytokine faiblement synthétisée au niveau des mégacaryocytes et par la suite séquestrée dans les granules- α des plaquettes (172,173). Suite à l'activation des plaquettes par le biais des stimulateurs comme la thrombine par exemple, les plaquettes libèrent le PF4. PF4 est un pro-coagulant et inhibiteur de l'héparine. Dans l'hématopoïèse, PF4 inhibe l'activation des CSH et maintient leur état de quiescence suite à l'inhibition d'IL-8 (169-171). Ce qui est intéressant, c'est que, par la synthèse de PF4, les mégacaryocytes inhibent leur développement. *In vivo* et *in vitro*, cette cytokine réduit le nombre de colonies mégacaryocytaires, leurs tailles et leurs marqueurs de surface caractéristiques (GpV) ainsi que la production des plaquettes (172-175) (**Figure 11**).

III.4.2. Les facteurs de transcription :

Les facteurs de transcription sont des acteurs principaux de l'orientation des CSH vers la différenciation mégacaryocytaire. Certains facteurs de transcription interviennent pendant les phases précoces de la différenciation dans lesquelles les CSH sortent de leur état de quiescence pour se différencier en mégacaryocytes. Une autre partie des facteurs de transcription régule la différenciation pendant les étapes tardives (formation et libération des plaquettes). Parmi ces facteurs, on cite : GATA1/FOG1, RUNX1, Tal1, Fli-1, c-Myb, NF-E2, MKL1.

Les facteurs de transcription s'interfèrent durant les différents stades de la différenciation mégacaryocytaire pour moduler la chromatine. Ces modulations déclenchent l'expression des gènes responsables de la progression de la différenciation mégacaryocytaire.

GATA1/FOG1 :

GATA est un facteur de transcription en doigt de zinc. La famille de GATA est formée de six membres de poids moléculaire de 50 kDa. GATA1 est découvert dans les années 80 et connu par son rôle dans la différenciation mégacaryocytaire et érythrocytaire. On distingue dans la structure de GATA1 la présence de deux doigts de zinc du côté N- et C-terminal. Le doigt de zinc du côté N-terminal permet à GATA1



d'interagir avec FOG1 (Freind of GATA1) et l'autre du côté C-terminal assure l'interaction avec l'ADN. FOG1 est le cofacteur de GATA1. C'est une protéine de neuf doigts de zinc connue aussi par ZFPM1 (zinc finger protein). Malgré la présence de ces doigts, jusqu'à présent il n'existe aucune preuve de son interaction avec l'ADN (181). L'expression de GATA1 et son cofacteur est redondante en terme spatiotemporel et essentielle pour l'orientation des MEPs (progéniteurs communs mégacaryocytaires et érythroblastiques) en faveur de la différenciation mégacaryocytaire (182). GATA1 joue le rôle d'un activateur de gènes impliqués dans la mégacaryocytopoïèse. La déficience en GATA1 dans la lignée mégacaryocytaire inhibe la formation des plaquettes ainsi que la polyploïdisation de ces cellules (178-180). GATA1 inhibe la prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires. En outre, l'absence ou la réduction de l'expression de GATA1 induit la prolifération des mégacaryocytes ayant un cytoplasme immature avec un nombre de granules- α réduit ainsi qu'un réseau de membranes internes fortement désorganisé (183,184). En outre, la présence des mutations au niveau de GATA1 réprime son affinité avec ZFPM1. Ces mutations sont responsables de l'induction de plusieurs types de maladies comme la « X-linked thrombocytopenia ». Dans ce cas, la perte de l'affinité diminue le nombre et la maturation des mégacaryocytes ainsi elle altère le nombre et la qualité des plaquettes (186–188).

RUNX1 :

RUNX1 est connu encore comme AML1 ou CBF α (Core Binding Protein α). RUNX1 est toujours lié à son cofacteur, CBF β . Ce partenaire est essentiel pour augmenter l'affinité du complexe à l'ADN malgré qu'il n'interagisse jamais avec lui. Par le biais du domaine RUNT, RUNX1 fixe sur les promoteurs des gènes cibles sur une séquence consensus « runt-binding double-stranded DNA element » (RDE). RUNX1 est essentiel dans le développement des CSH ainsi que des mégacaryocytes (189,190); de nombreuses études ont montré l'augmentation de l'expression de RUNX1 au cours de la différenciation mégacaryocytaire (186-188). Les mutations au niveau de RUNX1 sont capables d'induire plusieurs anomalies parmi lesquelles le trouble plaquettaire familial et les LAM. Cliniquement, ces maladies sont marquées par une thrombocytopénie modérée (186,189-191). Selon Bluteau et al. en 2012, dans les mégacaryocytes extraits de ces patients, l'expression de MYH10 (non-muscle myosin IIb) est perturbée (197). MYH10 est responsable de la séparation de deux cellules filles suite à la fin de mitose. En présence de RUNX1, l'expression de MYH10 est inhibée ce qui assure le passage de la mitose en endomitose (198).



Nombreuses sont les études qui montrent que l'inactivation de RUNX1 induit un rapide et profond impact sur la mégacaryocytopoïèse sans aucun impact sur l'érythropoïèse (189,195,199). Selon Grown et al. et Ishikiwa et al., la délétion induite de RUNX1 dans des souris adultes induit une diminution de cinq fois du nombre des plaquettes dans le sang. Selon ces études, les moelles osseuses de ces souris présentent une augmentation du nombre de mégacaryocytes mais avec une morphologie anormale. Ils ont noté que les mégacaryocytes sont de petite taille, hypolobulés avec une augmentation du nombre de CFU-MK (189,195).

TAL1 :

TAL1 (SCL/TAL1, T-cell acute leukemia protein 1) est un facteur de transcription capable de réguler l'hématopoïèse (maintien de la quiescence des CSH) et certaines leucémies. Des études réalisées sur des souris adultes montrent que le « knockout » de TAL1 induit une répression de la différenciation mégacaryocytaire et une réduction du nombre des plaquettes (195-198).

Les mutations au niveau de TAL1 induisent une augmentation de p21 (CDKN1A, « cyclin-dependent kinase inhibitor 1A ») ce qui inhibe par la suite la mégacaryocytopoïèse (204). TAL1 est capable d'assurer la bonne formation et la libération des plaquettes en augmentant l'expression de MEF2C (myocyte enhancer factor 2C). Les souris déficientes en MEF2C montrent une diminution du nombre de plaquettes, celles-ci étant de grande taille et présentant une granulation anormale (205).

c-myb :

c-myb (c-myeloblastosis viral oncogene homologue (avian)), est un facteur de transcription responsable de l'orientation des progéniteurs MEP (progéniteurs communs mégacaryocytaires et érythroblastiques) en faveur de la différenciation érythrocytaire (202, 203). c-myb et son coactivateur p300 induisent le remodelage de la chromatine pour activer les gènes érythrocytaires (207). *In vivo*, il a été montré que la mutation monoallélique de c-myb est suffisante pour augmenter le nombre de plaquettes et de mégacaryocytes (206). Une autre étude par Mukai et al. montrent qu'une insertion transgénique en amont du gène codant pour c-myb dans les progéniteurs MEP dévie l'orientation de ces cellules vers la différenciation mégacaryocytaire. En outre, ils ont montré une expansion du compartiment des CFU-MK (208). Kaspar et al. ont montré que les souris déficientes en p300 imitent le profil des souris déficientes en c-myb. Ils ont observé une augmentation du nombre de mégacaryocytes et des plaquettes circulantes (209).



NF-E2 :

C'est un facteur de transcription formé de deux sous-unités : p45 et p18. p18 (MAF) est ubiquitaire, ne possède aucune activité transactivatrice et assure l'interaction avec l'ADN et d'autres protéines, tandis que p45 est la sous-unité active responsable de la régulation de différents gènes impliqués dans la mégacaryocytopoïèse. NF-E2 est un membre de la famille bZIP (basic-leucine zipper) (210,211). Des études ont montré que le « knock-out » de NF-E2 induit une sévère thrombocytopénie avec une inhibition de la formation des plaquettes. Ce qui est intéressant de noter c'est que le « knock out » de NF-E2 n'affecte pas la maturation mégacaryocytaire mais affecte la plaquetto-genèse. Ces études montrent que les mégacaryocytes sont géants, hyperlobulés et accumulés dans la moelle osseuse et la rate. En revanche, la maturation cytoplasmique est freinée ce qui inhibe la formation des plaquettes (183,212,213)

Fli-1 :

Fli-1 (Friend Leukemia virus integration 1) est un facteur de transcription appartenant à la famille des facteurs de transcription « E26 Transformation Specific family » (ETS). Les mutations au niveau de Fli-1 induisent plusieurs anomalies parmi lesquelles le syndrome de Paris Trousseau (Jacobens, PTS). La macro-thrombocytopénie (une diminution du nombre de plaquettes libérées) est l'un des symptômes cliniquement déclarée chez les patients de PTS. Une surexpression de Fli-1 induit une orientation des cellules vers la différenciation mégacaryocytaire et réprime la différenciation érythrocytaire (209-211). Selon Vo et al., la délétion de Fli-1 au niveau des mégacaryocytes dérivés des cellules souches induites (iPSC) déclenche une thrombocytopénie accompagnée d'une diminution de la demi-vie des plaquettes ainsi que de leurs fonctions (214). *In vivo*, Hart et al. ont montré que la délétion totale de Fli-1 induisait la mort des embryons à 11.5 jours. La mutation monoallélique de Fli-1 de ces souris induit des symptômes semblables au syndrome de Paris Trousseau (PTS) avec une déficience du nombre de mégacaryocytes et une augmentation du nombre des progéniteurs CFU-MK (217). Moussa et al. en 2010 ont montré que les souris portant une mutation homozygote de Fli-1 (domaine régulateur tronqué du côté C-terminal) subissent une mort létale à hauteur de 30% de la population totale. Les souris viables présentent une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation mégacaryocytaire : C-mpl, GpIIb, GpIV, GpIX, PF4, NF-E2, MafG (musculoaponeurotic fibrosarcoma homolog G) et Rab27B. Ce qui est intéressant, c'est que ces souris présentent



une diminution de l'expression de GATA-1, ce qui montre une connexion entre les facteurs de transcription pour accomplir la différenciation (216).

MKL1 :

MKL1 (Megakaryoblastic leukemia 1) appartient à la famille des myocardines, connu dans la LMA. Tous les membres de cette famille sont attachés à SRF (Serum Response Factor). Cet attachement est essentiel pour la fixation de MKL1 sur les « Serum Responsive Element » (SRE) présents dans les promoteurs des gènes cibles (76,218,219). L'expression de MLK1 augmente lors de la différenciation mégacaryocytaire des HELs (Human Erythroleukemia cells) (220) et les cellules CD34⁺ primaires (221). *In vivo*, les souris « knock down » pour le gène codant SRF montrent une diminution du nombre des mégacaryocytes, une diminution du marquage CD41⁺ et de la polyploïdie (221).

La synergie entre les différents facteurs de transcription est importante pour induire la différenciation mégacaryocytaire. Une étude conduite par Elagib et al. en 2003 montre que l'interaction physique et fonctionnelle entre RUNX1 et GATA1 est essentielle pour induire l'expression de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 2$ durant la différenciation mégacaryocytaire. La mutation de trois régions de fixation de RUNX1 au niveau du promoteur de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta 2$ induit une diminution de l'effet de GATA1 sur le promoteur de gènes cibles (192).

En second lieu, GATA1 est capable de réguler l'expression de NF-E2 p45 en fixant sur la région promotrice du gène codant pour cette protéine. Takayama et al. montrent que GATA1 est capable de fixer p45 sur une région de 38 acides aminés du côté N-terminal. Dans la même étude, l'expression transgénique de p45 dans les souris déficientes en GATA1 est insuffisante pour corriger la thrombopénie. Ceci montre que GATA1 régule un réseau de facteurs de transcription indispensables à la mégacaryocytopoïèse (222).

Un autre type d'interaction existe entre Fli-1 et GATA1/FOG1. Une étude conduite par Starck et al. en 2003 montre que la fixation de Fli-1 au niveau des promoteurs de gènes impliqués dans la mégacaryocytopoïèse nécessite une interaction physique avec GATA1/FOG1 pour activer l'expression de ces gènes cibles (223). Zang et al. en 2016, ont montré que dans les étapes finales de la maturation mégacaryocytaire, les régions amplificatrices du chromatine (séquences d'ADN qui contrôle la transcription des gènes à distances) riches en H3K4me2 (histone H3 lysine 4 diméthylation) sont caractérisées par des séquences motifs pour fixer NF-E2, Fli-1 et RUNX1. Ces motifs



de fixation sont situés l'un à côté de l'autre. Ils agissent en synergie et renforcent l'activation de gènes cibles en comparaison avec les régions qui ne sont occupées que par un seul facteur de transcription (224).

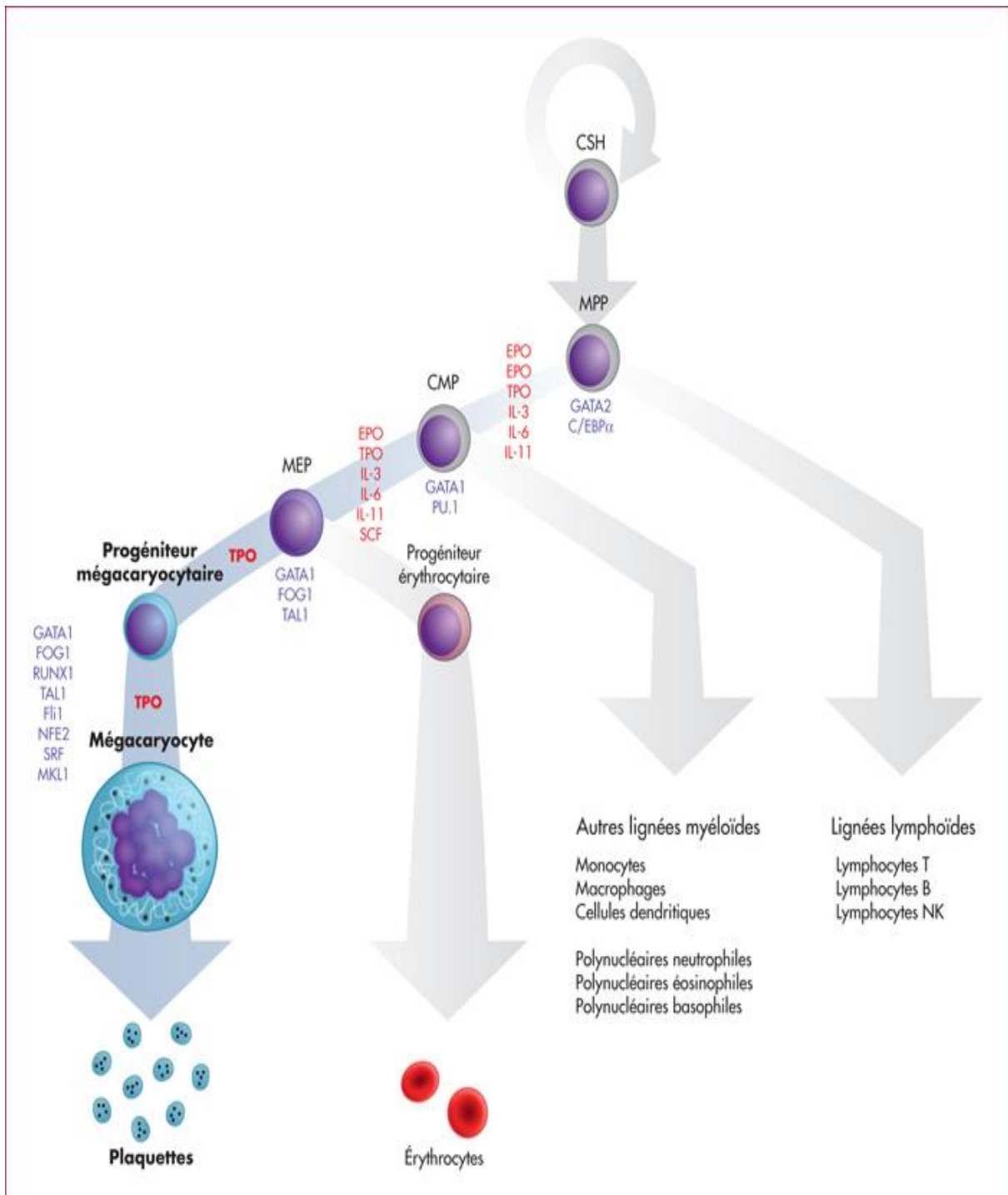


Figure 11 : facteurs de transcription et cytokines régulant les différents stades de la différenciation des mégacaryocyte (CSH-Mégacaryocytes).

MEP : (progéniteurs mégacaryocytaires et érythroblastiques), CMP : (progéniteurs myéloïdes communs), MPP : (progéniteurs pluripotentes) (175).



Chapitre IV. Apoptose ou mort cellulaire programmée

IV.1. Le rôle physiologique de l'apoptose

La mort cellulaire programmée ou « apoptose » est une voie d'homéostasie cellulaire utilisée par la cellule pour éviter sa transformation en cellule responsable de différentes pathologies comme le cancer et les maladies auto-immunes. Historiquement, les cellules apoptotiques ont été décrites la première fois par Currie, Kerr et Willie en 1972 (225). L'apoptose protège les cellules de la prolifération non contrôlée. Les aspects morphologiques caractéristiques de l'apoptose sont essentiellement la diminution de la taille des cellules, la fragmentation d'ADN, la condensation de la chromatine et du cytoplasme et la formation de corps apoptotiques. Les organelles sont emprisonnés dans les corps apoptotiques puis seront libérés pour être dégradés par phagocytose (225) (**Figure 12**). Un déficit en apoptose est la cause de plusieurs pathologies comme la maladie de Parkinson (226), la maladie d'Alzheimer (227) et le SIDA (228). De plus, l'apoptose joue un rôle très important durant l'embryogenèse en détruisant le blastocyte durant la formation des organes. En outre, des études ont montré l'implication de l'apoptose durant la remodelage des membranes fœtales lors de la période de grossesse (229,230).

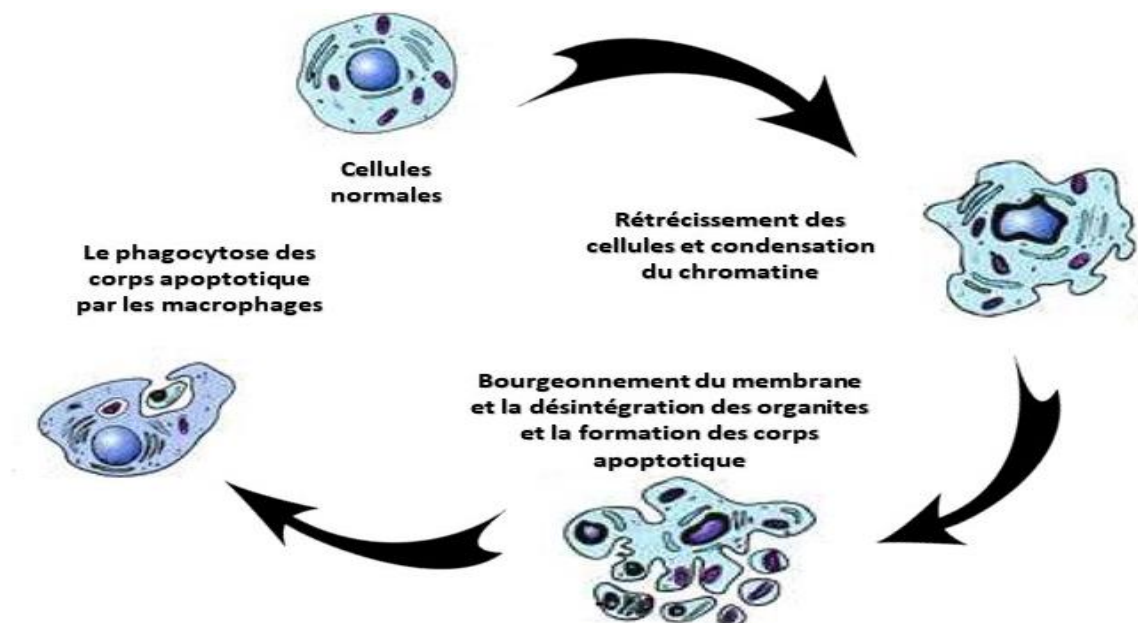


Figure 12 : aspects morphologiques des cellules en apoptose par comparaison aux cellules normales.

La condensation du chromatine, l'effondrement du noyau et des organites ainsi que la formation des corps apoptotiques caractérisent les cellules en apoptose (182).



IV.2. Les voies d'induction de l'apoptose :

L'apoptose est divisée en deux principales voies de signalisation cellulaire :

IV.2.1. La voie apoptotique intrinsèque (voie mitochondriale) :

La voie d'apoptose intrinsèque est induite par des signaux internes à la cellule. Les stimulus activent les voies internes qui agissent sur la mitochondrie directement (231,232). L'apoptose intrinsèque se déroule dans mitochondrie où il y a rapidement une perturbation du potentiel membranaire mitochondrial suite à l'interaction entre les protéines de la famille Bcl-2 à BH3 seulement « BH3 only-proteins » avec le VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) (229–231). Cette interaction conduit à la dissipation du potentiel membranaire mitochondrial et induit la libération du cytochrome c, acteur principal de l'apoptose mitochondriale avec une perte de la perméabilisation des membranes mitochondriales externe et interne (236). Suite à cette étape, le cytochrome c s'associe avec APAF-1 (Apoptotic Protease-Activating Factor 1) via son motif WD-40 ce qui induit le changement de la conformation de APAF-1 en utilisant l'ATP, ceci induisant une oligomérisation en heptamère : ce complexe est alors nommé apoptosome (236–238).

Le rôle de ce complexe est d'activer la procaspase-9 en caspase-9 initiateur de l'apoptose. À son tour, la caspase-9 va activer les caspases effectrices-3, -7 et -6. Les caspases effectrices sont responsables de la fragmentation d'ADN et de la condensation de la chromatine (239–241).

Deux autres complexes sont libérés de l'espace inter-mitochondrial, sont Smac/Diablo et HtrA2/Omi. Ils sont capables d'activer l'apoptose en inhibant les XIAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins) (242,243). L'inhibition des XIAP active la caspase-3 entraînant la phase exécutoire de l'apoptose (**Figure 16**).

Le processus intrinsèque d'apoptose est régulé par des protéines de la famille des membres Bcl-2 (B cell lymphoma 2). La protéine p53 (suppresseur de tumeur) joue un rôle important dans la régulation de l'expression génomique de ces protéines (239-242). Cette famille est divisée en trois sous-familles : le premier groupe constitue les protéines anti-apoptotiques (MCL-1, BCL-2, BCL-X, BCL-X_L, BAG, BCL-XS, BCL-W, BCL-B). Dans cette catégorie, les protéines sont composées de 4 domaines d'homologie : BH1, BH2, BH3 et BH4 (248); le deuxième groupe constitue les protéines pro-apoptotiques (BOK, MTD, BAK, BAX). La structure de ces derniers est formée de 3



domaines d'homologie : BH1, BH2, BH3, BH4 étant absent ; enfin la dernière sous-famille est la famille des Les protéines de la famille Bcl-2 à BH3 seulement : BIM, PUMA, BAD, BIK, NOXA, SPIKE, BMF, BCL-G (249–252) (**Figure 14**).

IV.2.1. La voie apoptotique extrinsèque (voie des récepteurs de mort cellulaire) :

La voie de mort cellulaire extrinsèque est induite par l'activation des récepteurs de mort cellulaire. Les récepteurs du mort cellulaire, TNF-R (253), Fas-R (CD95-R) (254) et DR4/5 (death receptor 4/5) (255) sont activés respectivement par les ligands TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) (256,257), Fas-L (CD95-L) (258) et TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand) (259). Le changement de conformation suite à la fixation des ligands permet aux récepteurs de recruter d'autres protéines adaptatrices comme « Fas-Associated protein with Death Domain » (FADD) (260,261) et "Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain protein" (TRADD) (262). Pour les récepteurs Fas-R et DR4/5, la fixation de leurs ligands induit la formation du complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex) formé de FADD et pro-caspase-8 qui ensuite sera activé pour enclencher le processus apoptotique (260,263–265). Après activation du TNF-R, il y a recrutement de TRADD qui en association avec RIP1 (Receptor Interacting Protein) et cIAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins) forme le complexe I. Ce complexe déclenche la mort ou la survie cellulaire. Pour déclencher l'apoptose, en absence d'IAP, ce complexe interagit avec le complexe DISC. Suite à l'activation de caspase-8, la phase d'exécution est engagée (261-263) (**Figure 16**).

IV.2.2. Les caspases :

Les caspases sont des endoprotéases, représentées par 18 types chez les mammifères. Dans l'espèce humaine, les caspases ont été très décrites jusqu'à présent (269). Celles-ci jouent des rôles polyvalents dans la mort cellulaire (270), la prolifération (271), l'inflammation et l'immunité (272), la régénération des tissus (273), la différenciation (271), le développement (273), la régulation neuronale (274). En outre, les caspases peuvent avoir des rôles opposés dans le développement tumoral étant parfois un anti- ou pro-tumorales (275). Les treize caspases présentes dans l'espèce humaine (caspases-1, -4, -5, -12, -2, -9, -8, -10, -3, -6, -7, -14, -16) sont divisées en deux groupes selon leurs fonctions. La première catégorie correspond aux caspases apoptotiques : caspases-2, -3, -6, -7, -8, -9 et -10. Le deuxième groupe correspond



aux caspases non apoptotiques : caspases-1, -4, -5, -11 et -12 (276). En 2017, La caspase -16 est identifiée comme une nouvelle caspase chez les mammifères (269). Son rôle dans l'apoptose reste non défini pour le moment.

Les caspases apoptotiques sont sous-divisées en caspases initiatrices de l'apoptose (caspases-2, -8, -9, -10) et les caspases exécutrices de l'apoptose (caspases-3, -6, -7, -16) (271-273) (**Figure 13**).

IV.2.2.1. La structure des caspases :

Les caspases appartiennent à la famille des cystéine-aspartique proteases. Avant d'être activées, elles sont sous forme de procaspases ou zymogènes dépourvues de leurs activités enzymatiques (279).

Les caspases partagent une structure qui les différencient des autres protéases (280,281). La structure générale des caspases dont on peut trouver une homologie est formée d'une grande sous-unité de 20 kDa (p20) centrale extrapolée du côté carboxy-terminal et d'une petite sous-unité de 10 kDa (p10) (282,283). Dans la grande sous-unité, il y a un motif consensus pentapeptidique QACXG dans lequel il y a le résidu conservé actif Cys284 responsable de l'activité catalytique des caspases. Du côté amino-terminal, de la grande sous-unité, on trouve le prodomaine. La différence entre les caspases initiatrices et exécutrices est la longueur de ce domaine. Les caspases initiatrices sont connues par leur prodomaine long constitué de motifs d'interaction protéine-protéine : CARD, Caspase-Recruitment Domains et DED, Death Effector Domain qui assurent leur dimérisation et/ou leur recrutement vers des protéines adaptatrices pour les activer. Les caspases exécutrices sont caractérisées par un prodomaine court (280,281) (**Figure 13**).

IV.2.2.2. L'activation des caspases

Les caspases sont activées suite leur auto-clivage ou par d'autres caspases. Le clivage se fait toujours dans une séquence peptidique de 4 résidus d'acides aminés selon l'ordre suivant P4-P3-P2-P1 ou P1 est un aspartate. La caspase coupe le substrat exclusivement du côté C-terminal après un aspartate. Sous la forme zymogène, les procaspases-8, -9, -10 sont sous forme monomérique. Par contre, les procaspases-3, -6 et -7 sont sous forme de dimères. L'activation se fait par la séparation de la grande sous-unité (p20) de la petite sous-unité (p10) suite au premier clivage après le résidu aspartate. Pour obtenir une caspase active, un second clivage libère le pro-



domaine de la grande sous unité Les caspases actives sont des tétramères (hétérodimères) composés de deux p10 et deux p20 (277,279-281).

L'activation des caspases initiatrices aura lieu suite à l'interaction du domaine CARD ou DED de ces protéases avec des complexes protéiques adaptateurs comme le complexe DISC au niveau de la partie cytosolique des récepteurs de mort (TRAIL, Fas ...) (voie extrinsèque d'apoptose). Par exemple, l'interaction de la caspase-8 avec ces protéines entraîne son activation et par la suite une cascade de réactions amenant au terme du processus apoptotique. D'un autre côté, l'apoptosome formé lors de l'apoptose intrinsèque recrute la procaspase-9 après le changement de sa conformation. La caspase-9 s'auto-active pour amplifier le signal apoptotique (287–289) (**Figure 15, 16**).

IV.2.3. La phase d'exécution de l'apoptose :

Les caspases sont responsables de l'accomplissement de cette phase. Les caspases sont divisées en deux groupes : les caspases initiatrices et exécutrices. Les caspases initiatrices sont les caspases-2, -8, -9 et -10 et les caspases exécutrices sont les caspases-3, -6 et -7 (277,278). L'activation de la caspase-3 est essentielle pour terminer le processus apoptotique. CAD (Caspase-Activated DNase) est une endonucléase capable de cliver l'ADN et d'induire la condensation de la chromatine. Normalement, CAD est liée à son inhibiteur ICAD. La caspase-3 clive ICAD et libère CAD qui sera par la suite transloquée vers le noyau pour exercer son activité endonucléasique (290). Un autre substrat de la caspase-3 est la gelsoline, un inhibiteur de la polymérisation d'actine. Les fragments résultants du clivage de la gelsoline vont couper les filaments d'actine. La présence de ces clivages se traduit par la rupture du transport intracellulaire, la division cellulaire et la transduction du signal (291) (**Figure 16**).

IV.2.4. Interaction entre la voie intrinsèque et extrinsèque d'apoptose :

L'interaction entre ces deux voies apoptotiques existe même si les deux voies sont déclenchées séparément. Une fois la caspase-8 activée par le complexe DISC de la voie extrinsèque, il y a deux options : la première est l'activation de la procaspase-3 (287,290,292). La deuxième est le clivage d'une protéine de la famille de « BH3-only protéine » nommée Bid en t-Bid. Cette dernière s'intègre dans la membrane mitochondriale externe et induit la voie d'apoptose intrinsèque (293,294) (**Figure 16**).



IV.3. L'apoptose et la différenciation mégacaryocytaire :

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée. De nombreuses études ont montré l'importance de l'apoptose dans la formation des plaquettes et leur libération (295). Dans un premier temps, des chercheurs ont montré que les acteurs principaux de l'apoptose étaient exprimés lors du stade terminal de la maturation mégacaryocytaire à partir des cellules souches de la moelle osseuse ou des cellules cancéreuses à tendance mégacaryoblastique (295,296). Depuis les années 90, le rôle de la voie intrinsèque de l'apoptose est étudié durant la maturation des mégacaryocytes d'un côté et d'un autre côté dans le processus de libération et d'activation des plaquettes (296,297). Terui et al. ont montré que Bcl-X_L, facteur anti-apoptotique, était surexprimé significativement lors de l'initiation de la différenciation mégacaryocytaire (298). Cette étude a été confortée par des résultats ultérieurs qui ont validé les hypothèses précédentes en ajoutant que l'expression de Bcl-X_L était significativement élevée durant la différenciation mégacaryocytaire afin de maintenir la survie de ces cellules (299). En 2002, Kaluzhny et al. ont montré que la surexpression de Bcl-X_L dans les mégacaryocytes garantissait la maturation mais limitait la fragmentation et la libération des plaquettes (300).

D'autres études plus récentes ont suggéré qu'*in vivo* la délétion de Bak et Bax n'avait aucun impact sur la différenciation mégacaryocytaire ou sur la survie et le nombre de plaquettes. Par contre, l'inhibition de Bcl-2 dans des étapes précoces de la différenciation mégacaryocytaire déclenche la mort des mégacaryocytes, ce qui induit par conséquent la diminution du nombre des plaquettes sanguines (301).

Dans le même contexte, des publications récentes ont montré que la surexpression de p53 dans les mégacaryocytes immatures induit leur mort. En revanche, ce n'est pas le cas dans les mégacaryocytes en stade avancé où cela les incite à se fragmenter et libérer les plaquettes (302,303). Selon Apostolidis en 2012, la délétion totale ou conditionnelle de p53 induit l'augmentation de la polyploïdie des cellules K562 au cours de leur différenciation. Cela signifie alors que la maturation des cellules mégacaryocytaires progresse après suppression du processus apoptotique (302).

En revanche, l'implication de l'apoptose dans les stades terminaux de la maturation des mégacaryocytes est essentielle pour achever une parfaite libération et fragmentation des plaquettes. Selon Botton et al. en 2002, la localisation de la caspase-3 dans la cellule détermine son avenir. Pour initier la plaquetto-genèse, la caspase-3 doit



être présente dans le cytoplasme sans avoir une relation directe avec l'apoptose (304). En 2006, Leger et al. ont montré l'existence d'une activité précoce de la caspase-3 durant la différenciation mégacaryocytaire des cellules HELs induite par un stéroïde végétal, la diosgénine (13). Selon leurs résultats, l'expression protéique de Bcl-2 est élevée au début de la différenciation puis diminue progressivement jusqu'à la fin du processus (13).

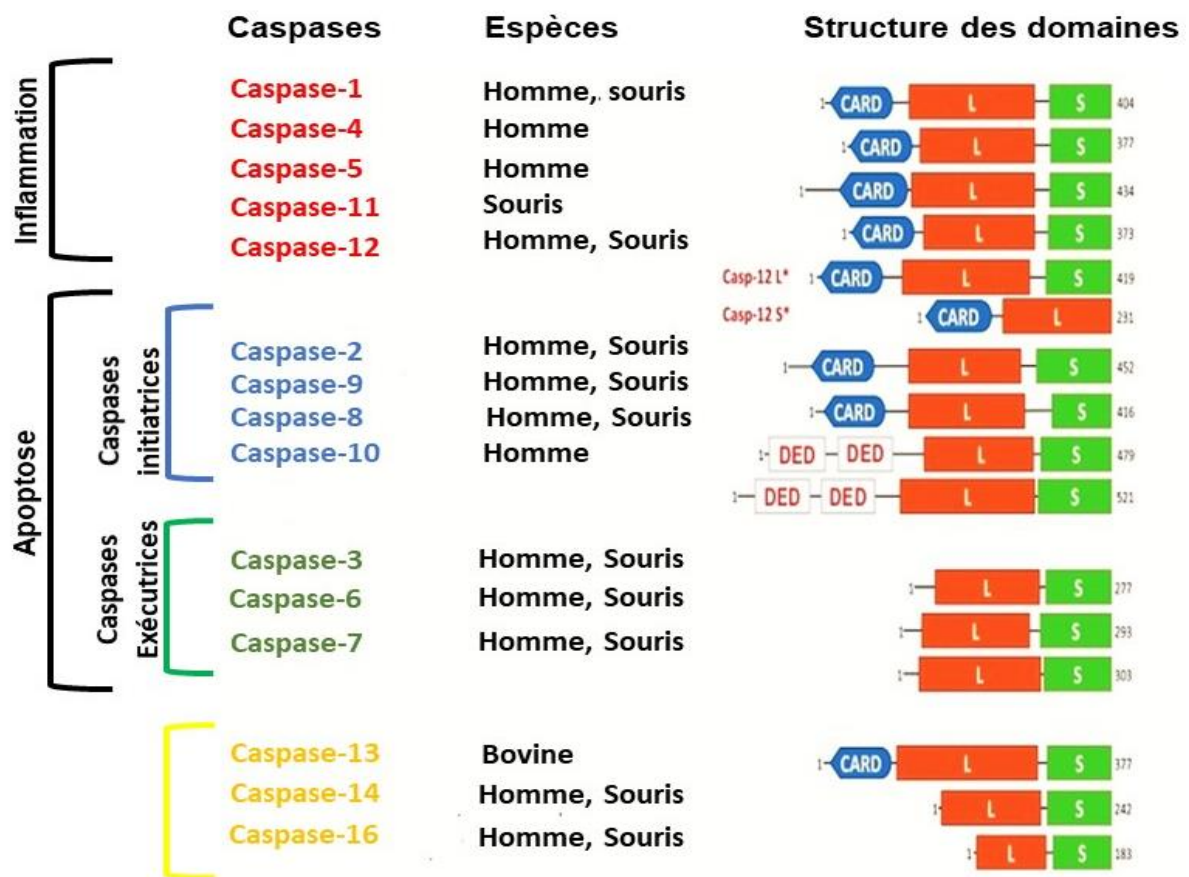


Figure 13 : structure des caspases chez l'homme et la souris.

Les caspases sont divisées en caspases d'inflammation (-1, -4, -5, -11 et -12) et les caspases d'apoptose (initiatrices : caspases-2, -8, -9 et -10 et exécutrices : -3, -6 et -7) et les caspases -13, -14 et -16. CARD : Caspase-Recruitment Domain. DED : Death Effector Domain (279).



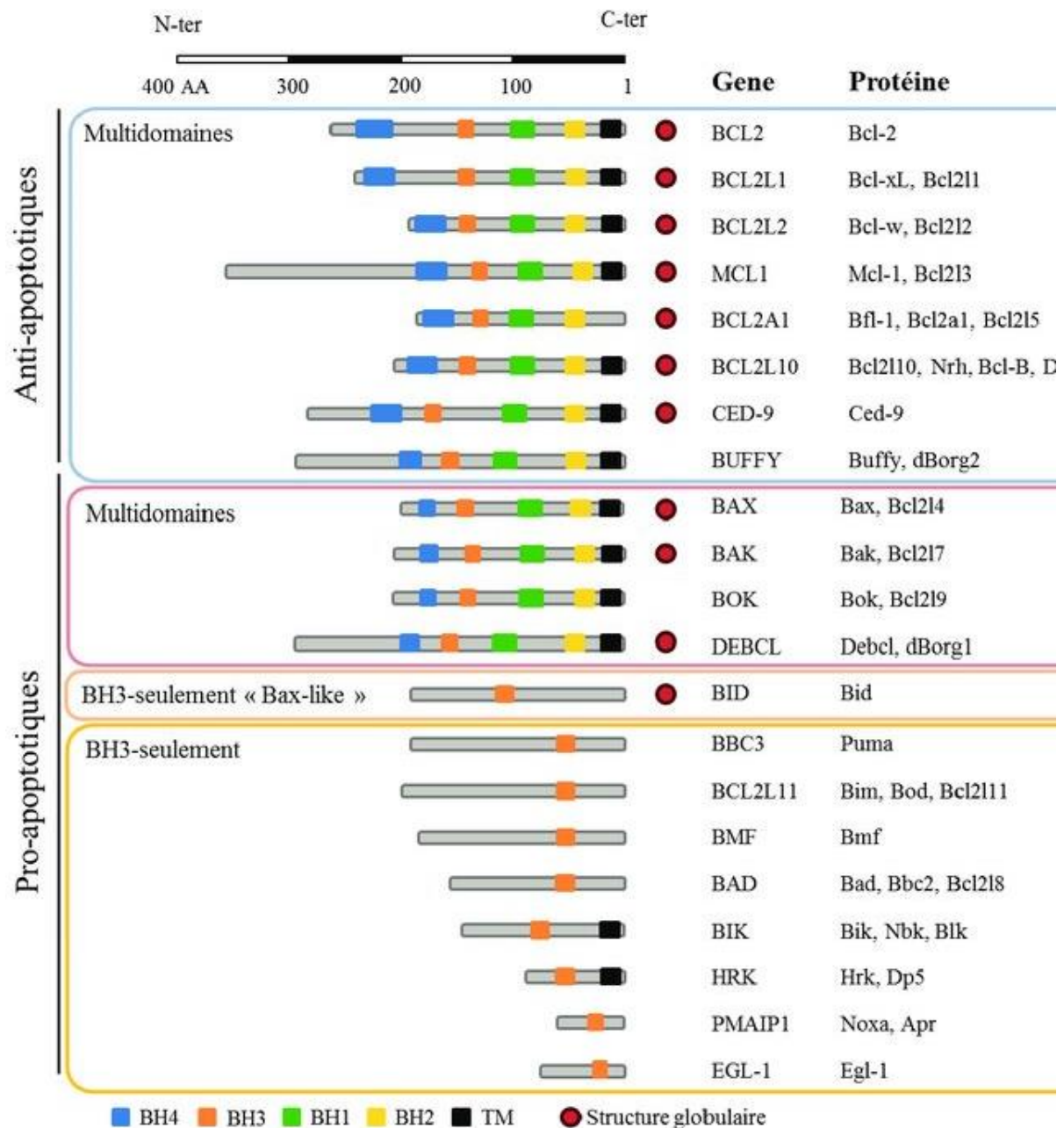


Figure 14 : structure des protéines de la famille de Bcl-2 (305).



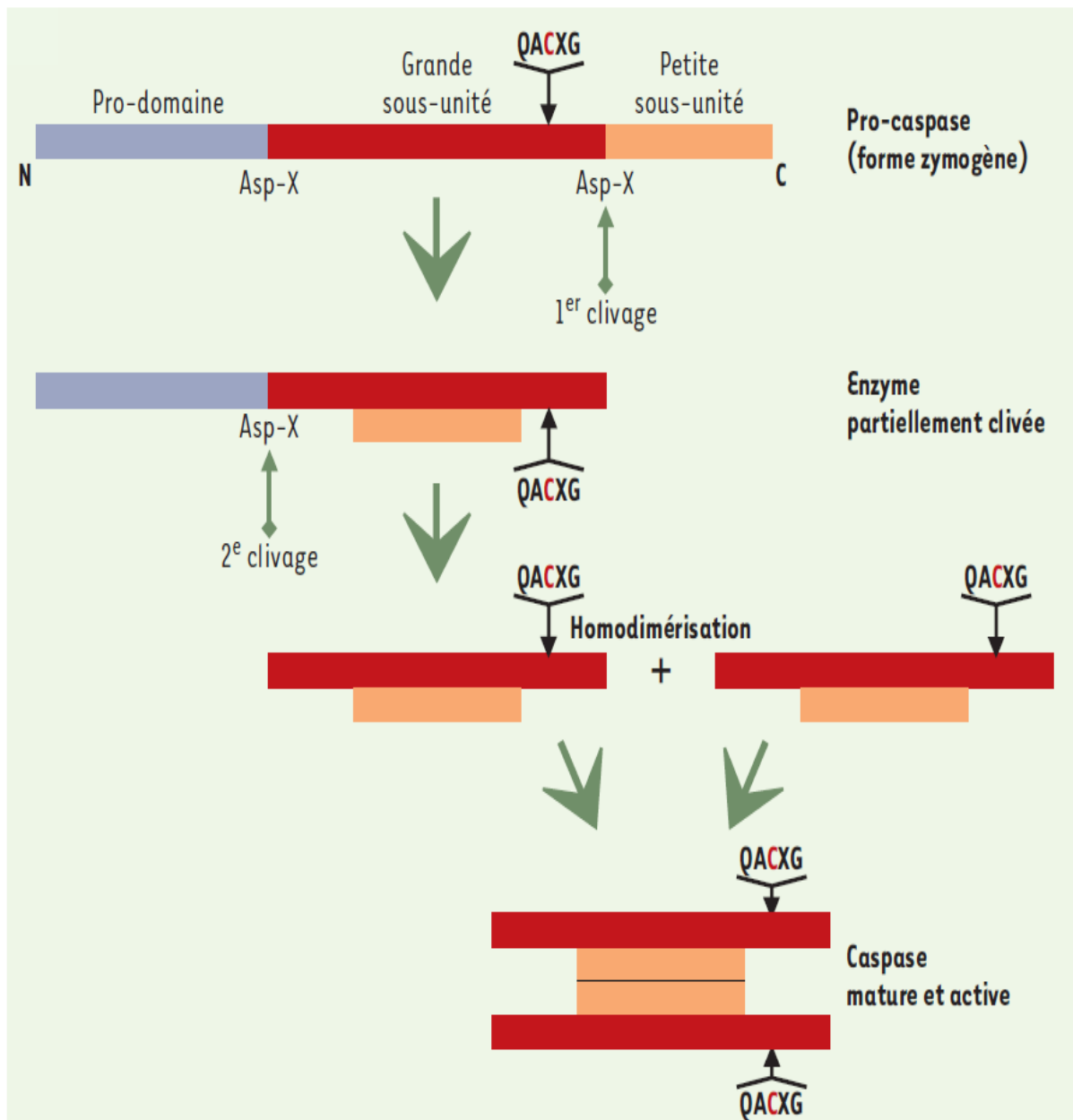


Figure 15 : étapes d'activation des caspases

L'activation se fait suite à une série de clivage de la caspase zymogène après un résidu aspartate : élimination du prodomaine et homodimérisation pour donner une caspase catalytiquement active (306).



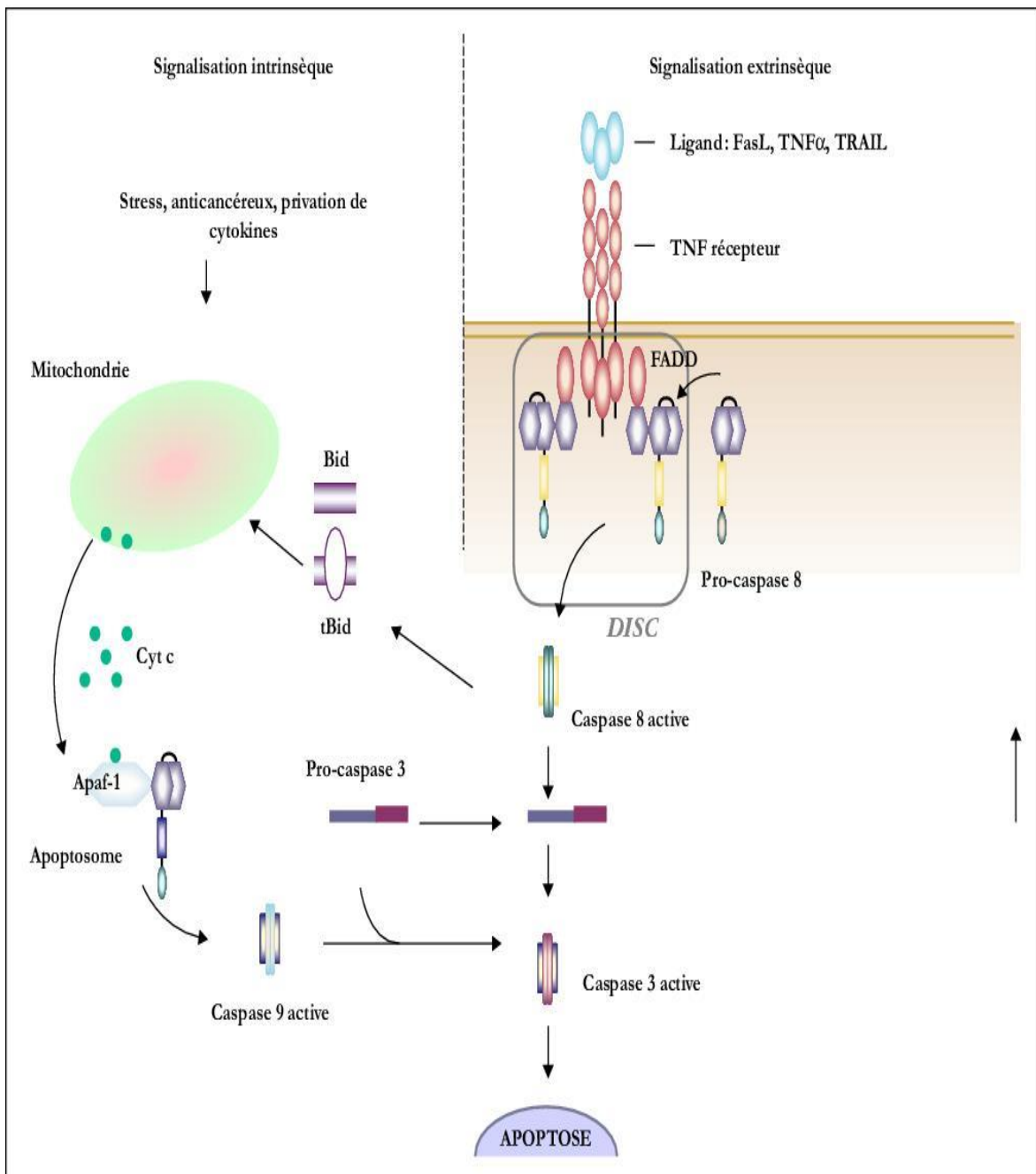


Figure 16 : voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.

La voie apoptotique intrinsèque est d'origine mitochondriale suite à l'exposition des cellules au stimulus externe (stress, irradiation,). La voie extrinsèque est induite suite à l'activation des récepteurs de mort par leurs ligands (TRAIL, Fas,.). La voie intrinsèque peut être activée par le clivage de Bid en t-Bid (truncated bid) par la caspase-8 (voie extrinsèque) (303).



Chapitre V. L'autophagie

L'autophagie est le processus de l'homéostasie cellulaire utilisé pour assurer un niveau de recyclage des organelles et des macromolécules à l'intérieur des cellules. Ce processus est nommé comme un deuxième type de mort cellulaire programmée après l'apoptose. Pour gérer le stress, les cellules induisent l'autophagie comme une voie adaptatrice de l'environnement (307). Les cellules qui sont exposées à une carence nutritionnelle (308), une radiation ionisante (309), une hypoxie (310), un stress énergétique (311) ou à des pathogènes induit l'autophagie pour se protéger et maintenir leur viabilité (312).

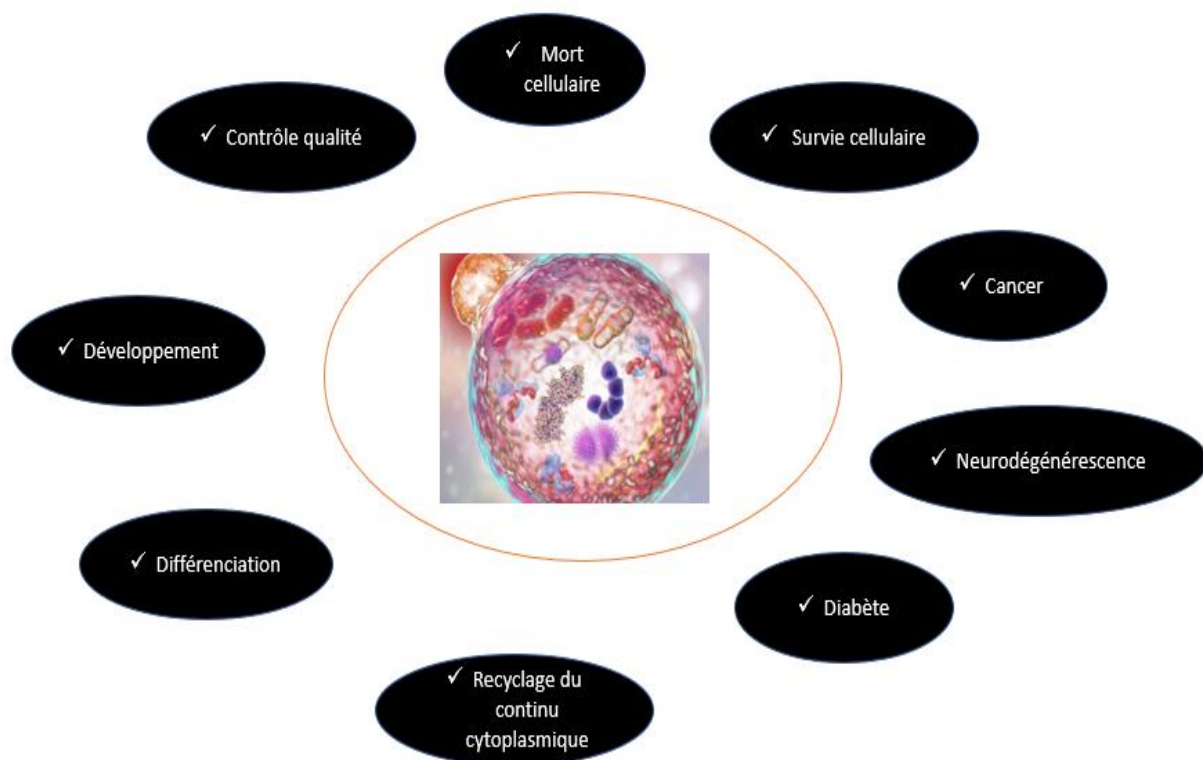


Figure 17 : fonctions essentielles de l'autophagie dans l'organisme.

Le terme d'autophagie est entendu la première fois en 1860 (313). Après un siècle, Christian de Duve a donné à l'autophagie sa définition actuelle comme une voie de « self-eating » suite à la dégradation du contenu cellulaire dans les lysosomes ce qui permet de donner aux cellules le contenu nécessaire en matières premières pour sa fonctionnalité (314,315). Ensuite, les chercheurs ont déterminé les fonctions de l'autophagie en exposant les cellules à différents types de stress et des molécules



chimiques (**Figure 17**). La découverte de l'aspect génétique activé lors de l'autophagie dans les levures par Yoshinori Ohsumi (316) additionnée aux efforts des autres chercheurs dans ce domaine ont permis de distinguer quatre types différents d'autophagie : la macro-autophagie (317), la micro-autophagie (318), l'autophagie médiée par les molécules chaperonnes (319) et récemment l'autophagie à RNA/DNA (320,321).

V.1. Les différents types de l'autophagie :

V.1.1. Microautophagie :

La micro-autophagie est un terme donné par Christian de Duve en 1966 (322). C'est un processus de dégradation du contenu cytoplasmique dans la lumière lysosomale. Le contenu cytoplasmique est déglutiné par les enzymes lysosomales suite à la différenciation de membrane lysosomale en tube d'autophagie puis son invagination et son scission. Ce processus existe chez tous les mammifères mais il a été étudié principalement chez les levures (323). Il peut être à la fois sélectif (« micropexophagie, microautophagie piecemeal, micromitophagie ») et non sélectif, cela dépendant du type de stress auquel les cellules sont exposées (carence nutritionnelle, hypoxie,...) (319-321). La microautophagie cible les protéines cytoplasmiques et peut avoir lieu simultanément avec les autres types d'autophagie (326,327) (**Figure 18**).

V.1.2. Autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) :

Elle existe chez tous les eucaryotes. Ce type est extrêmement sélectif. Les substrats dégradés sont des enzymes glycolitiques, des facteurs de transcription et leurs inhibiteurs, des sous-unités protéosomiques et des protéines engagées dans le trafic vésiculaire. Ces protéines portent le motif pentapeptidique KFERQ et constituent 30% de l'ensemble des protéines cytosoliques. Après être reconnues par la protéine chaperonne HSC70/HSPA8 (Heat Shock 70 kDa Protein 8), l'ensemble sera recruté à la membrane lysosomale où les protéines à dégrader seront dépliées. Par la suite, le complexe entre en contact avec le récepteur monomérique LAMP-2A (Lysosomal-Associated Membrane Protein 2A) qui se multimérise pour assurer la translocation du complexe vers la lumière lysosomale où il se dissocie (328,329) (**Figure 18**).



V.1.3. Autophagie à ADN/ARN (RNautophagie and DNautophagie) :

En 2013, Yuki Fujiwara a découvert ce nouveau type est spécifique pour les acides nucléiques (ADN et ARN). Ce processus est ATP-dépendant. Contrairement à CMA, le récepteur membranaire lysosomal LAMP-2C fixe les acides nucléiques par sa fraction cytosolique et les transloque aux lumières lysosomales pour qu'ils soient dégradés ultérieurement par des endonucléases et des exonucléases (320,321) (**Figure 18**).

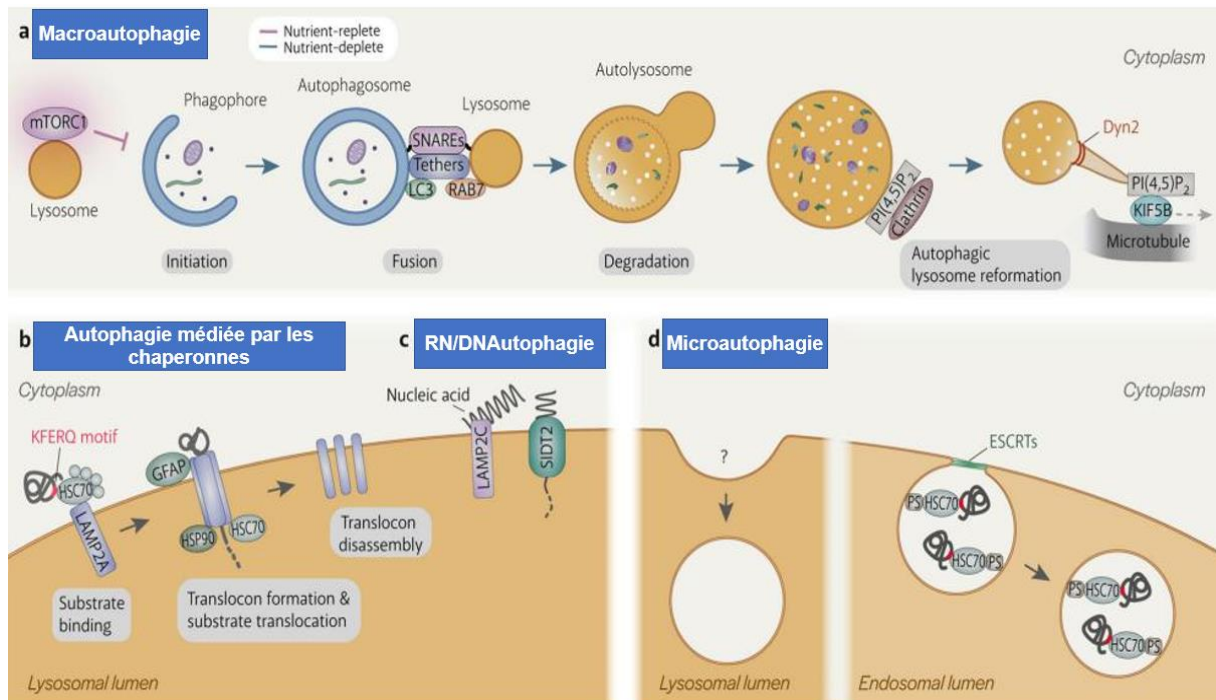


Figure 18 : différents types d'autophagie (329).

V.1.4. Macroautophagie :

La macroautophagie est le mécanisme le plus étudié par les chercheurs dans ce domaine. Dans la littérature et très souvent, les chercheurs réfèrent à la macroautophagie simplement par autophagie (330). C'est un mécanisme de recyclage et de contrôle-qualité du cytoplasme pour assurer l'homéostasie cellulaire contre le stress (carence en oxygène (331), carence en acide aminé (308), radiation ionisante (309), carence en énergie), la différenciation, le développement cellulaire (332). La macroautophagie se différencie des autres types d'autophagie par les atgs (autophagy related genes) qui régulent les étapes de ce processus. Suite à la séquestration du contenu cytoplasmique à côté ou sur le réticulum endoplasmique, une trentaine d'atgs



interviennent en plusieurs étapes pour former une double structure membranaire nommée autophagosome (333,334). Les étapes successives sont : l'initiation, la nucléation, l'élongation et la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (**Figure 19**).

V.1.4.1. L'initiation :

L'initiation est la première étape nécessaire au processus d'autophagie. L'initiation commence par la formation d'une structure en forme de coupe ouverte nommée phagophore au niveau du PAS (site d'assemblage de phagophore). Cette structure est formée suite au recrutement des Atgs (autophagy related proteins) et d'autres protéines adaptatrices pour former des complexes afin de réguler la formation des doubles structures membranaires lipidiques nommées l'autophagosome. Les sites de la formation des PAS sont divers parmi lesquels: la mitochondrie, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les endosomes tardifs, la membrane nucléaire et la membrane plasmique (332-335).

L'autophagie est induite par plusieurs stimuli notamment la carence en acide aminé ou en glucose. Pour induire l'initiation de l'autophagie, trois complexes sont impliqués :

- Le complexe mTORC1 (Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1) formé de la kinase mTOR (mammalian Target of Rapamycin), de Raptor (Regulatory Associated Protein of mTOR), de mLST8 (mTOR associated protein LTS8 homolog), de Deptor (DEP Domain Containing mTOR Interacting Protein) et de PRAS40 (Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa) (339,340),
- Le complexe ULK (UNC-51-Like Kinases) composé des protéines ULK1/2 (homologue d'ATG1), Atg13, FIP200 (FAK (Focal Adhesion Kinase) family Interacting Protein of 200 kDa) et Atg101 (341),
- Le complexe PI3K de classe III constitué de VPS34 (Vacuolar Protein Sorting 34), p15, Bécline-1, Atg14 et Ambra1 (Activating Molecule in Bécline-1 Related Autophagy protein 1) (342,343).

La régulation principale du flux macroautophagique est effectuée par le complexe mTORC1. Ce complexe inhibe l'autophagie en modulant la phosphorylation du complexe ULK1/2. ULK se forme instantanément dans le cytoplasme sans aucun stimulus et indépendamment de l'autophagie. L'interaction entre FIP200 et ULK1/2 est maintenue par l'hétérodimère Atg13 - Atg101 crucial pour l'activité kinase de ULK 1/2. Dans les conditions métaboliques normaux, le complexe ULK1/2 est inactif suite à la



phosphorylation de ULK1/2 et Atg13 par mTORC1. En revanche, en cas de stress métabolique, mTORC1 sera inactif et se dissocie de ULK1/2. Par la suite, ULK1/2 sera actif catalytiquement et s'autophosphorylera pour phosphoryler les autres résidus du complexe.

Ensuite, le complexe ULK1/2 sera transloqué au site PAS. Pour initier la formation du phagophore, ULK1/2 recrute le complexe PI3K complexe III et phosphoryle Bécline-1 (BECN1) et Ambra1 induisant ainsi l'activation de ce complexe. La phosphorylation de Bécline-1 est nécessaire pour l'interaction entre Ambra A1 avec le complexe VPS-34-Atg14L-BECN1 ainsi que l'interaction de l'ensemble avec d'autres protéines comme UVRAG (UV Resistance-Associated Gene) nécessaire pour l'élongation et la maturation de l'autophagosome. Le PI3K complexe III responsable de la production du lipide PI3P/PtdIns3P (Phosphatidylinositol-3-Phosphate), un médiateur de recrutement des autres protéines effectrices nécessaires pour l'élongation et la formation de l'autophagosome (344) (**Figure 19**).

V.1.4.2. L'élongation :

Suite à l'initiation et la production du lipide PI3P/PtdIns3P, l'élongation du phagophore en autophagosome s'accomplit par le système de conjugaison analogue à l'ubiquitination. Ce système consiste à assurer la fermeture de la double structure membranaire, suite à la séquestration du contenu cytoplasmique à dégrader hermétiquement à l'intérieur. En général, un système d'ubiquitination est composé de trois types d'enzymes : E1, enzyme activatrice, E2, enzyme de conjugaison et E3, ubiquitine ligase. Ce système établit la liaison entre le résidu glycine de l'ubiquitine et le résidu lysine de la protéine cible.

Le phagophore va s'allonger et s'incurver sur lui-même afin d'enfermer le cargo cible à dégrader. Le système de conjugaison analogue à l'ubiquitination dans ce cas est représenté par 8 Atgs qui jouent les rôles des analogues aux enzymes d'ubiquitination. Ces derniers consistent à la formation d'un premier complexe Atg12-5 qui va jouer le rôle d'une enzyme analogue à E3 pour aboutir à la lipidation de LC3-I avec une phosphatidyléthanolamine (345) (**Figure 20**).

V.1.4.2.1. Le complexe d'élongation Atg12-Atg5 :

Atg12 est le premier Atg analogue d'ubiquitine. Par comparaison avec le système d'ubiquitination, Atg12 porte en C-terminal un résidu de glycine 186. Atg12 sera



activée par Atg7, un analogue de l'enzyme E1 activatrice dans le système d'ubiquitination. Atg7 va se lier à Atg12 par son résidu cystéine (Cys 507). Suite à cette liaison ATP dépendante, Atg12 sera ensuite transférée à Atg10 (analogue de E2, enzyme de conjugaison), complexe stabilisé par une liaison covalente. Atg10 va induire la conjugaison covalente entre le résidu glycine 186 d'Atg12 et le résidu lysine 149 d'Atg5. Ensuite le complexe Atg12-Atg5 s'associe avec Atg16L1 de façon non covalente pour former un nouveau complexe irréversible homodimérique Atg12²-Atg5²-Atg16L1². Ces étapes ne nécessitent pas la présence d'une enzyme analogue à E3 dans le système d'ubiquitination. L'ensemble sera recruté à la membrane externe du phagophore en cours d'élongation. La richesse du site d'assemblage de phagophore (PAS) en PI3P (Phosphatidylinositol-3-Phosphate) induit le recrutement du protéine WIPI2 (WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2). WIPI2 est essentielle pour le recrutement du complexe Atg12-5-16L1 cruciale pour effectuer la conjugaison de LC3-I avec PE (346–348) (**Figure 20**).

V.1.4.2.2. Le complexe d'élongation LC3-PE :

Chez les mammifères, il existe deux familles de protéines LC3 : LC3 (A, B, B2 et C) et GABARAP (Gamma-Aminobutyric Acid Receptor-Associated Protein). Ces deux familles interfèrent durant la macroautophagie. Pour la suite du paragraphe on nommera ces protéines LC3. Un autre système de conjugaison analogue au système d'ubiquitination vise à la conjugaison d'un résidu phosphatidyléthanolamine (PE) à LC3-I. LC3-I est la forme libre cytosolique. Une fois LC3-I conjuguée à PE, ce complexe nommé LC3-II s'associe par la suite aux membranes interne et externe du phagophore en cours d'élongation pour atteindre la maturation de l'autophagosome. Le deuxième système de conjugaison utilise deux Atgs possédant des activités analogues aux enzymes d'ubiquitination (E1 et E2) et le complexe Atg12-Atg5-Atg16L1. En premier lieu, Atg4B (cystéine protéase) est responsable du clivage de l'Arg 117 en C-terminal de LC3-I afin que le résidu Gly 116 de ce dernier soit exposer et prête pour entrer dans le premier système de conjugaison. Ensuite, la première étape consiste à l'activation par l'intermédiaire d'Atg7 analogue de E1 (enzyme d'activation) en établissant une liaison thioester entre la Cys 507 et la Gly 116. LC3-I sera ensuite transférée à Atg3 (analogue de E2, enzyme de conjugaison) et Atg7 sera libérée. Finalement, Atg12-Atg5-Atg16L1, un analogue E3 (Enzyme de conjugaison du système d'ubiquitination) est responsable de la lipidation de LC3-I avec PE. Une liaison amide entre le



carboxy group de Gly120 de LC3 et l' amino groupe de Phe119 de PE est établie suite à la libération d'Atg3. Il faut mentionner que la conjugaison de LC3 est réversible et cela dépend de l'état de déficience nutritionnelle dans les cellules.

Actuellement, la conversion de LC3-I en LC3-II est considérée comme un marqueur du flux autophagique. Elle est détectée par plusieurs techniques de biologie moléculaire (Western blot, immunofluorescence, ...). Pendant les étapes finales de la maturation de la double structure membranaire, les Atgs seront dissociées. Après la fermeture totale de l'autophagosome, les protéines LC3 sont présentes exclusivement sur la face intérieure avec le cargo à dégrader (346,348,349) (**Figure 21**).

V.1.4.3. La fusion de l'autophagosome avec le lysosome :

Le but de la macroautophagie, c'est la dégradation du contenu cytoplasmique afin d'alimenter les cellules avec l'énergie nécessaire pour leur survie. Le recrutement de la machinerie nécessaire pour la fusion avec les lysosomes commence avec la maturation de l'autophagosome. Plusieurs facteurs importants interagissent à ce niveau :

- Le HOPS complexe : « homotypic fusion and protein sorting », la petite GTPase RAB7(RAS-related in Brain 7), SNARE (Soluble N-éthylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor) et d'autres protéines adaptatrices.

Les protéines adaptatrices sont responsables de l'interaction entre ces trois facteurs afin d'assurer le rapprochement entre l'autophagosome et le lysosome. Avec le stress métabolique, les lysosomes sont recrutés au niveau de la zone perinucléaire. LC3-II qui se trouvent dans la membrane interne autophagosomale est essentielle pour la fusion avec les lysosomes ; ils sont capables de recruter des protéines nommées SNARE (Soluble N-éthylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor).

Après la fermeture des autophagosomes, ils sont déplacés par l'intermédiaire des microtubules vers la zone perinucléaire. Le complexe de dynéine associé aux microtubules est responsable de leur orientation. Dans un premier temps, les membranes externes des deux vacuoles fusionnent. Les hydrolases lysosomales s'infiltrant dans l'espace inter-membranaire des autophagosomes et commencent ainsi la dégradation de la membrane interne. La fusion s'accomplit par le contact entre le contenu des autophagosomes et la lumière lysosomale. Dans certains cas, les autophagosomes fusionnent avec des endosomes pour donner des amphiosomes. Cela est



nécessaire pour alimenter ces structures avec des molécules qui facilitent leurs fusions ultérieures avec des lysosomes (350,351) (**Figure 19**).

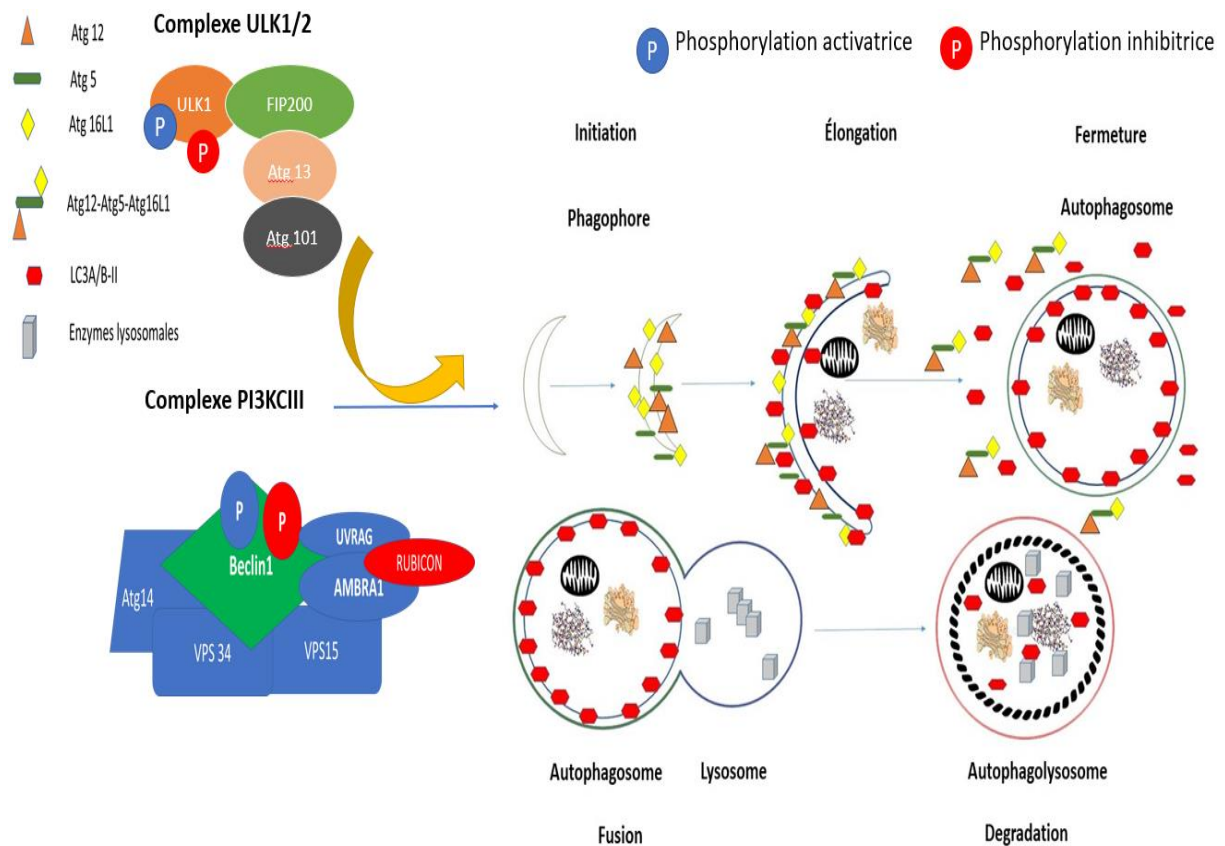


Figure 19 : la macroautophagie, étapes de la formation des autophagosomes
L'initiation, l'élongation, la fermeture et la fusion avec les lysosomes constituent les différentes étapes de la formation de l'autophagosome.

Suite à l'activation de complexe PI3KCIII par le complexe ULK1/2, l'initiation commence par l'assemblage du phagophore. Le site d'assemblage de phagophore est riche en Phosphatidylinositol-3-Phosphate (PI3P) qui contribue au recrutement des Atgs (Atg7, Atg10, Atg12, Atg5, Atg16L1, Atg4). Ces Atgs forment un système analogue à l'ubiquitination capable d'assurer l'élongation de l'autophagosome suite à la conjugaison de LC3-I à la phosphatidyléthanolamine (PE) pour donner la forme LC3-II. Cette dernière va s'associer à la membrane externe et interne de l'autophagosome pour garantir sa fermeture. Suite à la fusion de l'autophagosome avec le lysosome, les protéines LC3-II sur la membrane externe sont libérées et celles qui sont du côté intérieur vont être dégradées et recyclées sous l'effet des enzymes lysosomales.

Adapté de Ravikumar et al., 2009 (342).



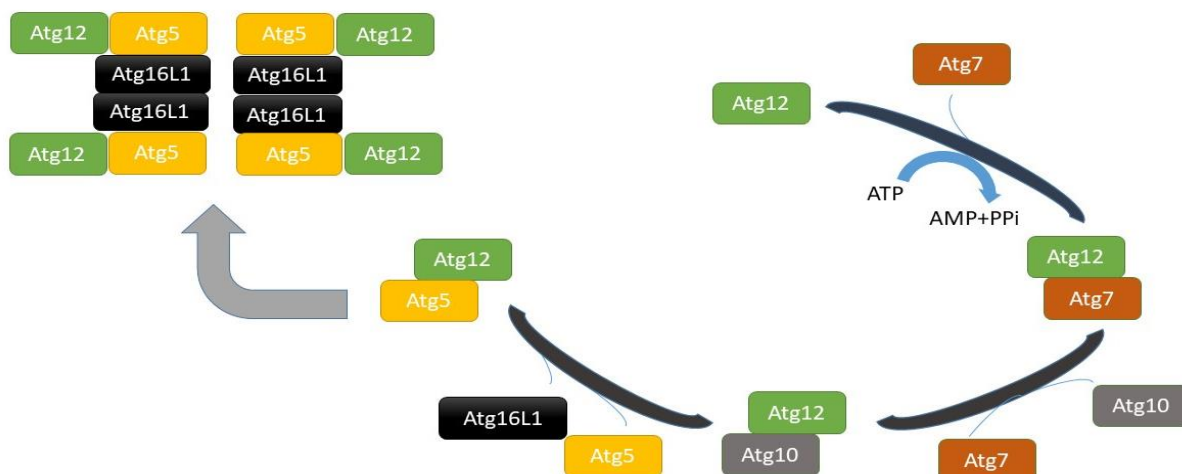


Figure 20 : premier système de conjugaison analogue à l'ubiquitination
Il conduit à la formation de l'homodimère d'Atg12-Atg5-Atg16L1. Atg7 joue le rôle d'analogue de l'enzyme E1, activateur du système d'ubiquitination. Atg7 assure la liaison entre Atg12 et Atg10. Atg10, un analogue de l'enzyme E2 dans le système d'ubiquitination, assure la conjugaison d'Atg12 avec Atg16L1 et Atg5. Adapté de Ravikumar *et al.*, 2009 (342).

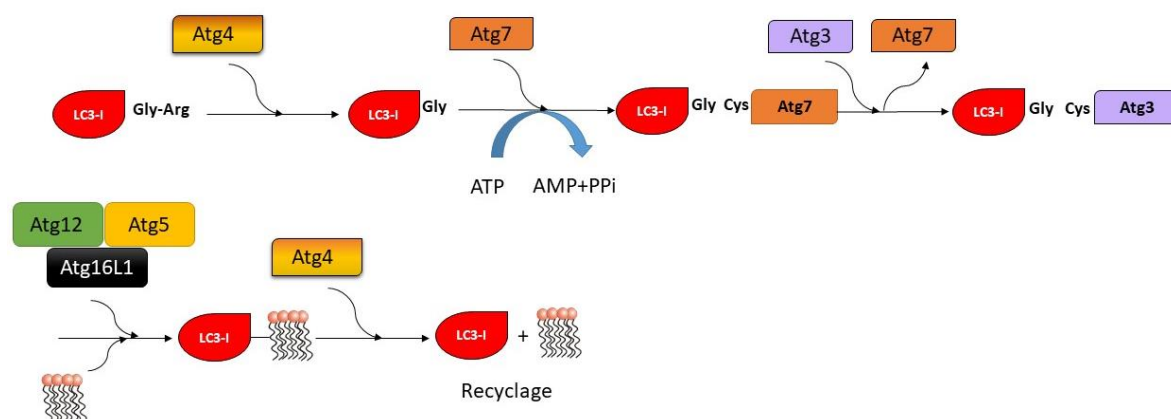


Figure 21 : deuxième système de conjugaison analogue à l'ubiquitination
Il consiste à conjuguer LC3-I avec la phosphatidyléthanolamine (PE). Suite à l'activation de LC3-I par Atg4, Atg7 assure le transfert de LC3-I à Atg3. Atg3, un analogue de l'enzyme de conjugaison E2 du système d'ubiquitination, transfère LC3-I au complexe Atg12-Atg5-Atg16L1 (analogue de l'enzyme E3 du système d'ubiquitination). La dernière étape est la lipi-
dation de LC3 avec PE par le biais de Atg12-Atg5-Atg16L1. Adapté de Ravikumar *et al.*, 2009 (345).

V.2. La régulation de l'autophagie

L'autophagie est un deuxième type de mort cellulaire programmée. Sur le plan physiologique, cette voie assure l'homéostasie des cellules en recyclant le contenu du cytoplasme (macromolécules et organelles endommagés) pour assurer les sources de



la survie cellulaire. L'autophagie agit contre les différents types de stress énergétique et nutritionnel (hypoxie, radiation ionisante, Unfolded Protein Response (UPR), carence en acides aminés, en glucose, en ATP). Selon la littérature, l'autophagie présente un paradoxe entre son rôle dans la cytoprotection (viabilité cellulaire) et dans la mort cellulaire. L'interaction de cette voie avec d'autres types de mort cellulaire, notamment l'apoptose, nécessite un réseau de voies de signalisation interagissant entre elles pour définir le destin des cellules. Parmi elles, on cite les voies PI3K/Akt/mTORC1, AMPK/LKB1, NF- κ B, l'interaction entre Bcl-2 et Bcl-2, et les voies indépendantes de mTORC1 comme cAMP-Epac-PLC-IP3 (protéine d'échange directement activée par cAMP), Ca²⁺-calpain-G α , Ras-cAMP- PKA et les céramides. Dans notre contexte, nous aborderons seulement les voies régulatrices de l'autophagie en relation avec la différenciation mégacaryocytaire.

V.2.1. La voie PI3K/Akt/mTORC1.

En cancérologie, cette voie est considérée comme pro-tumorale induisant la prolifération anormale des cellules cancéreuses. PI3K/Akt/mTORC1 est une voie principale dans la régulation de l'autophagie de façon directe ou indirecte. Dans les conditions normales, la présence des facteurs de croissance induit l'activation de PI3K/Akt par l'intermédiaire des récepteurs à tyrosine kinase. Cette activation induit la voie MAP kinases (Ras/RAF/ERK) et inhibe le complexe TSC1/2 (Tuberous sclerosis protein complex) afin d'activer mTORC1. L'activation de mTORC1 est généralement liée à la présence importante de certains acides aminés particulièrement la leucine, la glutamine et l'arginine. L'activation de mTORC1 se fait suite à la phosphorylation inhibitrice de TSC1/2 ce qui induit l'activation de Rheb (Ras homolog enriched in brain) en échangeant le GDP par du GTP. Rheb ensuite se détache du complexe avec TSC1/2 et active mTORC1. mTORC1 peut être activée par une voie indépendante de TSC1/2 par le biais des RAGS GTPase (Ras-related GTPases) et GEF (Guanine exchange factor regulator) au niveau des lysosomes. mTORC1 réprime l'autophagie par la phosphorylation de Atg13, ULK1/2 ou Ambra-1 associée à la classe III phosphatidylinositol-3 kinase complex (PI3KC3) (352). L'activité de mTORC1 peut être inhibée par AMPK/LKB1 ce qui induit le flux autophagique (353). En outre, mTORC2 peut inhiber l'autophagie via l'axe mTORC2/Akt/FOXO3. Dans les conditions de stress, FOXO3 est localisée normalement dans le noyau pour transcrire les gènes impliqués dans le pro-



cessus autophagique. Une fois Akt activée, elle inhibe FOXO3 par phosphorylation ce qui inhibe ensuite la transcription de ces gènes (354).

En conclusion mTORC1 ainsi que mTORC2 sont capables d'inhiber le flux autophagique de façon directe et indirecte (**Figure 22**).

V.2.2. La voie LKB1/AMPK (LKB1 Liver kinase B1/AMP-activated protein kinase, AMPK).

AMPK est une sérine/thréonine kinase responsable de l'activation de l'autophagie. Cette kinase joue un rôle très important dans les pathologies cardiovasculaires (355), l'obésité et le diabète (356), ce qui reflète sa distribution dans différents organes. AMPK est phosphorylée par plusieurs kinases au niveau du résidu Thr172 telles que LKB1 (353), Calmodulin-dependent protein kinases kinase 2 (CAMKK-2) (357) et TAK1 (Transforming growth factor- β -activating kinase 1) (358). L'activation d'AMPK dépend du ratio (AMP) ou (ADP)/(ATP) qui traduit l'état énergétique des cellules. Une fois que les cellules sont en déficience énergétique, LKB1 avec les 2 sous-unités STRAD et MO25 phosphorylent AMPK ce qui induit la voie autophagique. Par le biais de son activité kinase, AMPK phosphoryle plusieurs protéines comme mTORC1, TSC1/2, ULK1, Bécline-1, FOXO3 et PI3KC3 (355-359). AMPK kinase phosphoryle TSC1/2 au niveau des résidus Ser1345/Thr1227 ce qui active son activité GAP (GTPase-activating protein) inhibant ainsi mTORC1 (359). AMPK peut inhiber directement mTORC1 en phosphorylant cette dernière en Ser772/792 et lui associer la protéine 14-3-3. Cette association permet de restaurer l'activité d'ULK1 et d'induire sa liaison avec AMPK (364). D'une autre part, AMPK peut activer directement l'autophagie en phosphorylant ULK1 au niveau d'une région riche en proline et sérine, ou Bécline-1 en Thr388 afin d'inciter le complexe PI3KC3 à s'engager dans l'autophagie dans le cas de carence en glucose (361,365). AMPK induit l'autophagie via des facteurs de transcription comme FOXO3. Après la phosphorylation de FOXO3, il sera transloqué vers le noyau pour activer la transcription des gènes impliqués dans l'autophagie (360,366) (**Figures 22, 23**).

V.2.3. L'interaction entre Bécline-1 et Bcl-2.

Bécline-1 est une protéine essentielle pour la formation et l'initiation de l'autophagie. Cette protéine est formée de trois domaines (ECD, CCD et BH3) avec lesquels peuvent interagir différents types de protéines (367). Bcl-2 est une protéine anti-apop-



totique qui inhibe l'autophagie par son interaction avec Bécline-1 via son domaine BH3 au niveau du réticulum endoplasmique seulement. Cette interaction est nécessaire pour induire un équilibre entre l'apoptose et l'autophagie tant que la phosphorylation de Bécline-1 ou Bcl-2 ne peut pas aboutir à la dissociation ou à la stabilisation de ce complexe (368,369).

La dissociation entre Bécline-1 et Bcl-2 se fait par plusieurs façons :

- La compétition entre Bécline-1 et les autres protéines pro-apoptotiques possédant une affinité forte avec Bcl-2 comme tBid, Bad et BNIP3, Noxa, Puma, BimEL and Bik.
- Suite à la déficience nutritionnelle, Bcl-2 est phosphorylée par JNK-1 au niveau de trois résidus Thr69, Ser70 et Ser87 localisés dans des boucles non structurées. Dans les conditions de stress nutritionnel et énergétique, la phosphorylation de Bécline-1 se fait par plusieurs kinases comme DAPK (suppresseur de tumeur, death-inducing kinase) et ROCK1 (sérine/thréonine Rho kinase) au niveau du résidu Thr119 ce qui dissocie Bécline-1 de Bcl-2.

D'autres voies et protéines sont engagées dans la régulation de Bécline-1 :

- L'ubiquitination de Bécline-1 par TRAF-6 (Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 6) induit l'autophagie suite à l'oligomérisation de Bécline-1 conduisant ainsi à la formation du complexe PI3KC3.
- L'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) recrute Bécline-1 et la phosphoryle pour inhiber l'autophagie.
- Akt suite à son activation, Akt interagit avec Bécline-1 et l'inhibe après sa phosphorylation.
- AMPK active l'autophagie en phosphorylant Bécline-1 sur la Ser93 et la Ser96 afin de répondre au stress nutritionnel.
- Suite à un stress nutritionnel, Bécline-1 induit la formation du complexe PI3KC3 après sa phosphorylation par ULK1/2 ce qui le dissocie de Bcl-2. Bécline-1 recrute et interagit avec les autres membres du complexe PI3KC3 comme VPS-34, VPS-15 et Ambra-1 dans un premier temps puis avec UVRAG (suppresseur de tumeur, UV Radiation resistance-Associated Gene) afin d'assurer la formation et la maturation de l'autophagosome (363-366) **(Figure 24)**.



V.2.4. NF- κ B :

NF- κ B est un facteur de transcription connu comme proto-oncogène. Il est inhibé par I κ B- α (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha). Dans les contextes de survie cellulaire, IKK (I κ B kinase) phosphoryle I κ B- α et l'envoie vers l'ubiquitination ce qui rend NF- κ B active. Durant la différenciation mégacaryocytaire, Leger et al. ont démontré la diminution de la translocation nucléaire de NF- κ B, ceci comme indicateur de la maturation (13). NF- κ B module l'autophagie selon le contexte cellulaire (différenciation, inflammation, cancer). En même temps, L'autophagie est responsable du turn-over de IKK à l'intérieur des cellules en réponse à un stress chronique et par conséquent inhibe NF- κ B. En revanche, NF- κ B peut activer l'autophagie suite à un stress causé par un choc thermique, une voie impliquant la protéine de choc thermique HspB8 et BAG3 (BCL-2-associated athanogene 3) (371). D'autre part, l'analyse du promoteur du gène codant Bécline-1 montre que NF- κ B pourrait activer la transcription de ce gène. Ce n'est pas toujours le cas, NF- κ B pourrait inhiber l'autophagie en activant A20, un désubiquitinase de bécline-1 au niveau du site d'interaction avec le domaine BH3 des protéines Bcl-2 (372). De nombreuses études ont montré que l'activation de l'autophagie par NF- κ B implique obligatoirement IKK. En outre, l'utilisation de rapamycine induit l'activation de l'autophagie via un mécanisme qui implique l'activation d'AMPK et IKK suite à l'inhibition de mTORC1 ainsi que la dissociation de Bécline-1 de Bcl-2 par le biais de JNK1 (373). En même temps, IKK peut activer l'expression de plusieurs effecteurs d'autophagie comme LC3, Atg5, Bécline-1 indépendamment de NF- κ B en réponse à un stress aigu (déficience nutritionnelle) (374).



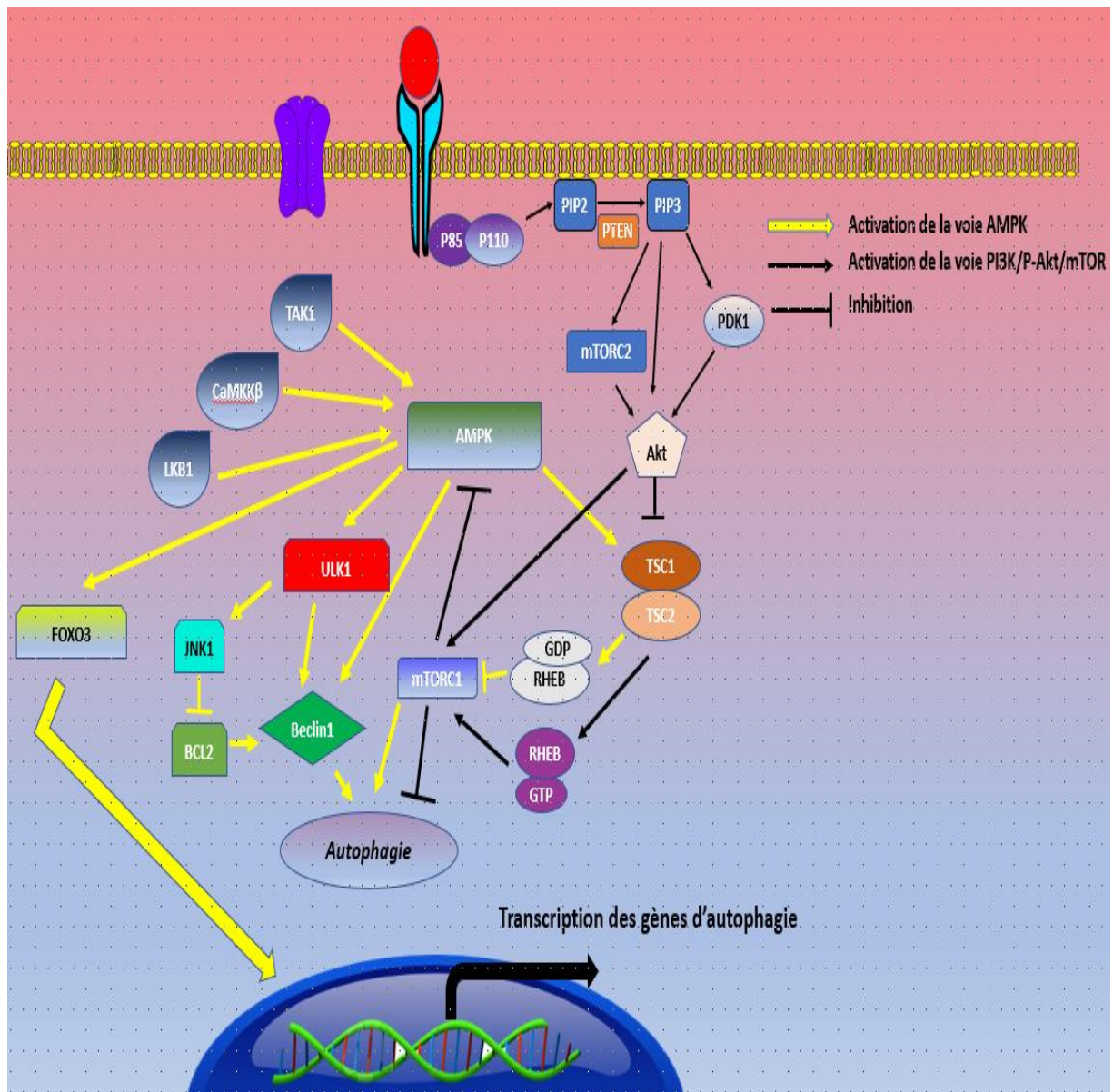


Figure 22 : voies de signalisation régulant l'autophagie : les régulateurs de AMPK, ULK1 et mTORC1

AMPK est une protéine clé dans l'activation de la voie autophagique. TAK1, LKB1 and CamKK phosphorylent AMPK et induisent l'activation de la voie autophagique. AMPK stimule l'autophagie directement en phosphorylant ULK1 (ULK1/2 complexe), Bécline-1 (PI3K-complexe III) ou indirectement en activant TSC1/2. TSC1/2 activée inhibe Rheb et par la suite mTORC-1. ULK1, catalytiquement active, induit la dissociation de Bécline-1 de son interaction avec Bcl-2 suite à l'activation de JNK1. Une fois libérée, Bécline-1 stimule l'autophagie. AMPK peut induire l'activation de FOXO3. FOXO3 est un facteur de transcription responsable de l'induction de la transcription de plusieurs gènes impliqués dans l'autophagie.



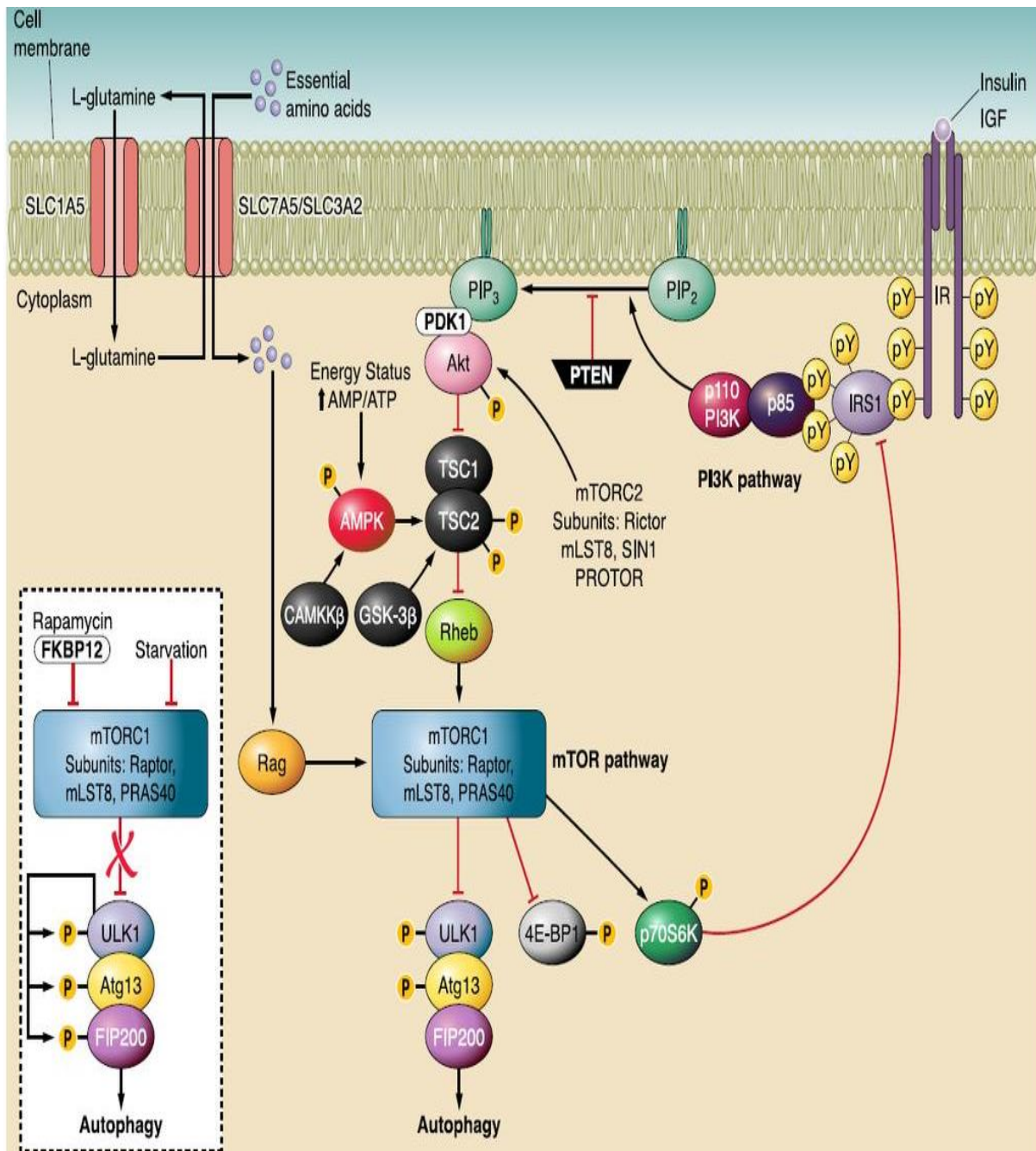


Figure 23 : voies de signalisation régulant l'autophagie.

En présence de facteurs de croissance, les récepteurs à tyrosine kinase sont activés. Ces récepteurs stimulent plusieurs voies de signalisation, parmi elles l'axe PI3K/Akt/mTORC1, régulateur principal de l'autophagie. Dans les conditions physiologiques, mTORC1 inhibe l'autophagie (phosphorylation inhibitrice d'ULK1). En conditions de stress, mTORC1 est inhibée et l'autophagie est activée. ULK1 s'autophosphoryle et stimule la phosphorylation d'Atg13 et FIP200 du complexe d'initiation ULK1/2

Source : Ravikumar *et al.*, 2009 (342)



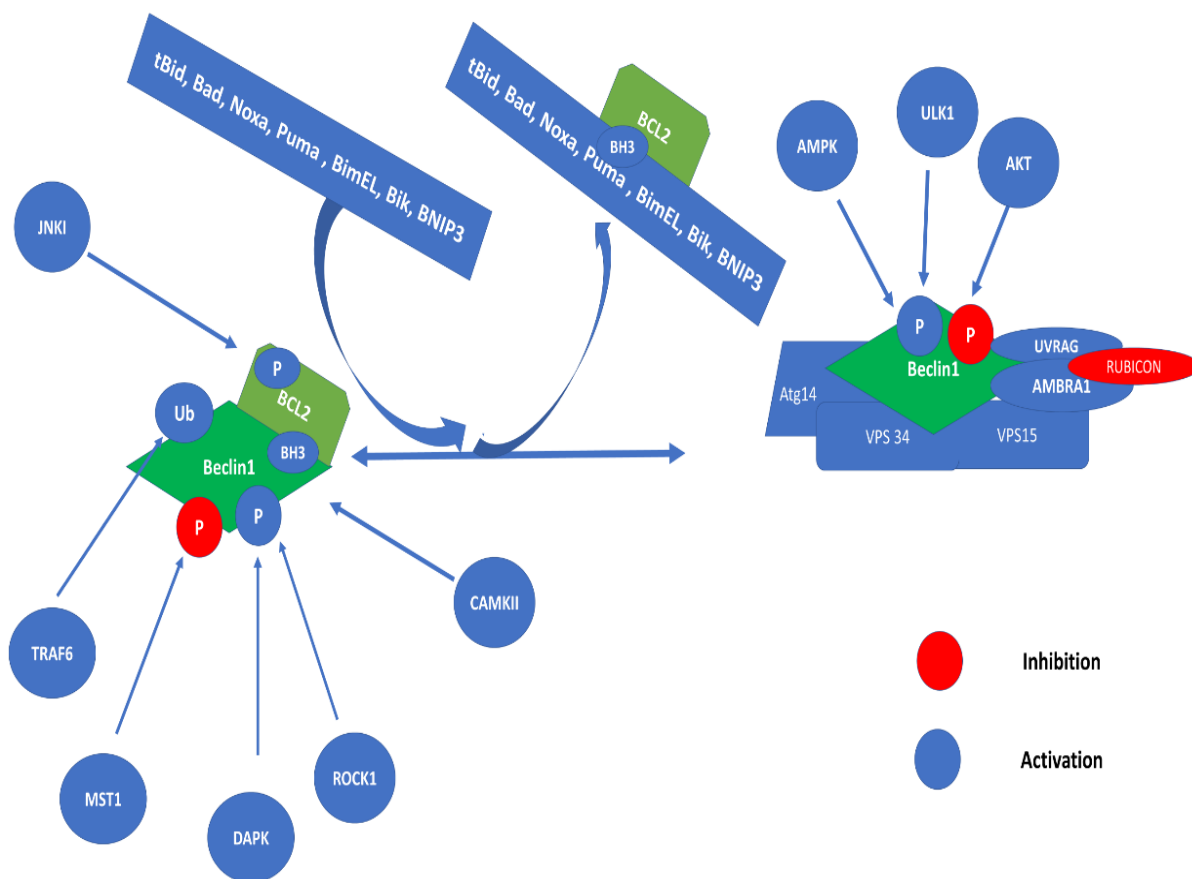


Figure 24 : régulation de l'autophagie suite à la dissociation du complexe Bécline-1/Bcl-2

Une série de phosphorylations inhibe ou active cette association. La phosphorylation de Bcl-2 par JNK1 ou la phosphorylation de Bécline-1 par TRAF6, MST1, DAPK, ROCK1, CAMKII induisent la dissociation de ce complexe. La libération de Bécline-1 induit l'activation de l'autophagie suite à son association avec le complexe PI3K-complexe III (VPS34, VPS15 et Atg14, Ambra A1). Suite à des conditions de déficience nutritionnelle, l'activation de Bécline-1 peut se faire suite à la phosphorylation par ULK-1 et AMPK directement afin que l'autophagie soit déclenchée. En revanche, plusieurs phosphorylations inhibitrices peuvent avoir lieu induisant ainsi l'inhibition de l'autophagie. Dans les conditions physiologiques, Bécline-1 peut être inhibée par Akt. En outre, durant l'élongation, l'autophagie peut être inhibée par l'association de Rubicon avec UVRAG ce qui empêche la fermeture de l'autophagosome.

V.3. Autophagie : le paradoxe différenciation/cancer.

L'autophagie est une voie d'homéostasie cellulaire. Dans les conditions physiologiques, en réponse au stress nutritionnel, énergétique, hypoxie ou radiation ionisante, l'autophagie vise à protéger la cellule contre tout dommage à l'ADN afin d'éviter l'apoptose. En revanche, après une dégradation excessive des protéines et une forte



dépense d'énergie, l'apoptose sera déclenchée (375). En hématologie, l'autophagie est importante dans la différenciation érythrocytaire, lymphocytaire et mégacaryocytaire. Notamment, dans les CSH, l'autophagie maintient leur quiescence ainsi que leur capacité d'auto-renouvellement. Afin de maintenir leur survie le plus longtemps possible, l'autophagie assure une clairance des mitochondries pour éviter la production de ROS dans les cellules (370-373). Ainsi, en 2017, une étude réalisée par Ho et al. a montré que l'inhibition de l'autophagie dans les CSH (délétion d'Atg12) augmentait l'oxydation phosphorylante induisant la formation des ROS et par la suite la mort cellulaire (Figures 25, 26). L'autophagie joue un rôle important dans la différenciation mégacaryocytaire. En 2015, Cao et al. ont montré que le « knockout » d'Atg7 dans les CSH inhibait la différenciation mégacaryocytaire. Par contre dans les mégacaryocytes matures, l'inhibition de l'autophagie ne montre pas d'effet sur la différenciation mégacaryocytaire (380) **(Figures 28, 29)**. Après deux ans, Wang et al., ont montré que la modulation de l'autophagie au début de la différenciation induisait une altération de la différenciation démontrant ainsi que le niveau basal de l'autophagie était important pour assurer le bon déroulement de la différenciation mégacaryocytaire (381). Dans le cas des cancers myéloïdes, le rôle de l'autophagie dépend du contexte comme elle est considérée parfois comme suppresseur ou promoteur de tumeur (377,382–384). Dans les CSH d'AML, la délétion des gènes Atg7 et Atg5 induit une inhibition de la survie et de la prolifération (385). L'autophagie joue un rôle paradoxal : elle peut agir comme un garant de la survie des CSC (cellules souches cancéreuses) ou comme un suppresseur de l'initiation des cancers leucémiques (382,383). En 2015, une étude de Watson et al. a montré que le balayage du génome de blastes AML affirme que l'expression des gènes impliqués dans l'autophagie comme Atg10, Atg5, Atg7, BECN1, GABARAP, GABARAPL1/2, et MAP1LC3B s'avère très basse, cela étant dû à la présence de profils de mutations et de délétions hétérogènes dans ces cellules. Au regard de ces résultats, l'activation de l'autophagie dans les blastes AML pourrait s'avérer être une stratégie de traitement anticancéreux en combinaison avec d'autres molécules conventionnellement utilisées. Cet effet rend l'inhibition de l'autophagie comme une stratégie thérapeutique intéressante par exemple en combinaison avec la cytarabine (inhibiteur de la synthèse de l'ADN) (376,383) **(Figure 25)**.



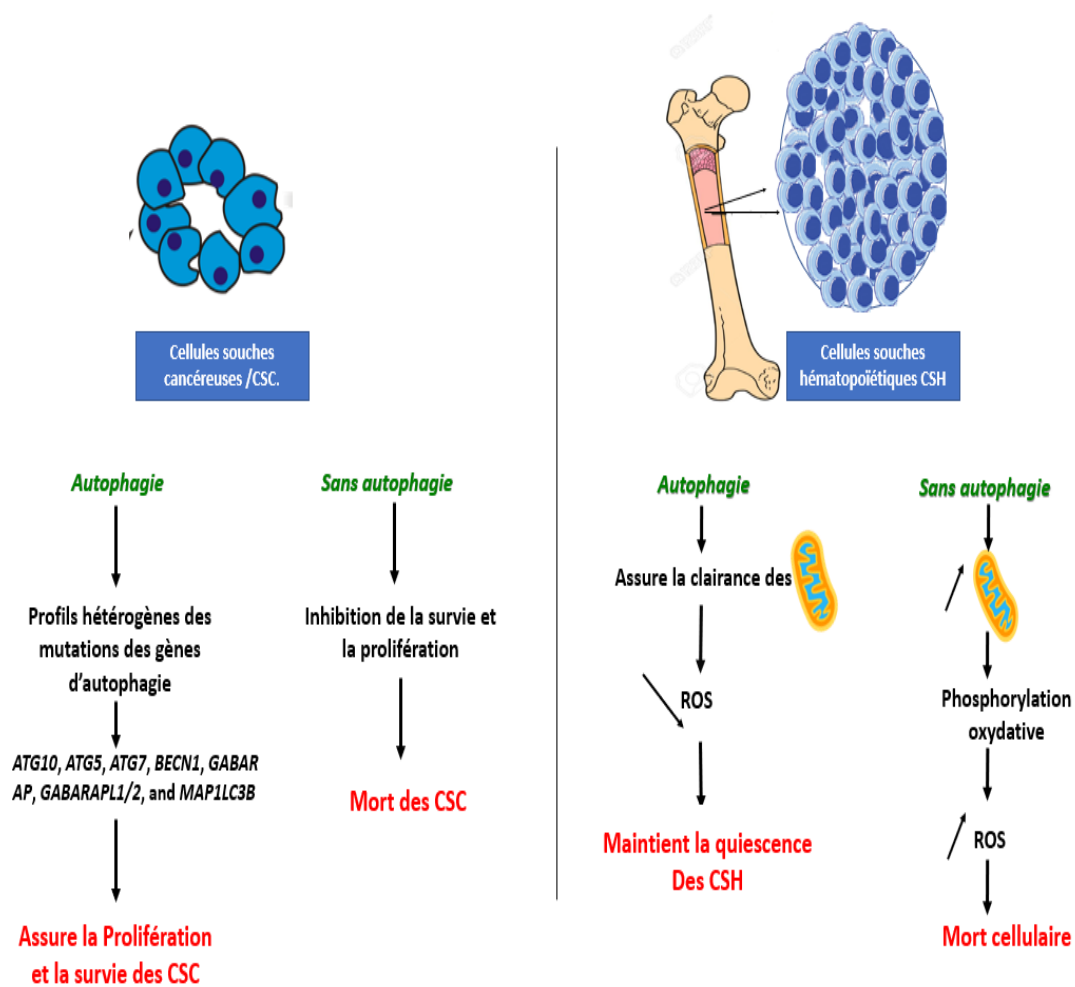


Figure 25 : rôle important de l'autophagie dans la survie des cellules souches hématopoïétiques (CSH).

En absence d'autophagie, les CSH accumulent les ROS (Radical Oxygen Species). Cette accumulation fait suite à l'absence de leur élimination par les mitochondries. Les cellules passent du mode glycolyse anaérobie à la phosphorylation oxydative. Les CSH sortent de leur quiescence et commencent la prolifération mais, à terme, entrent en apoptose vu l'accumulation de ROS. Les CSC d'AML suivent la même logique afin d'assurer leur survie et maintenir leur propre différenciation.



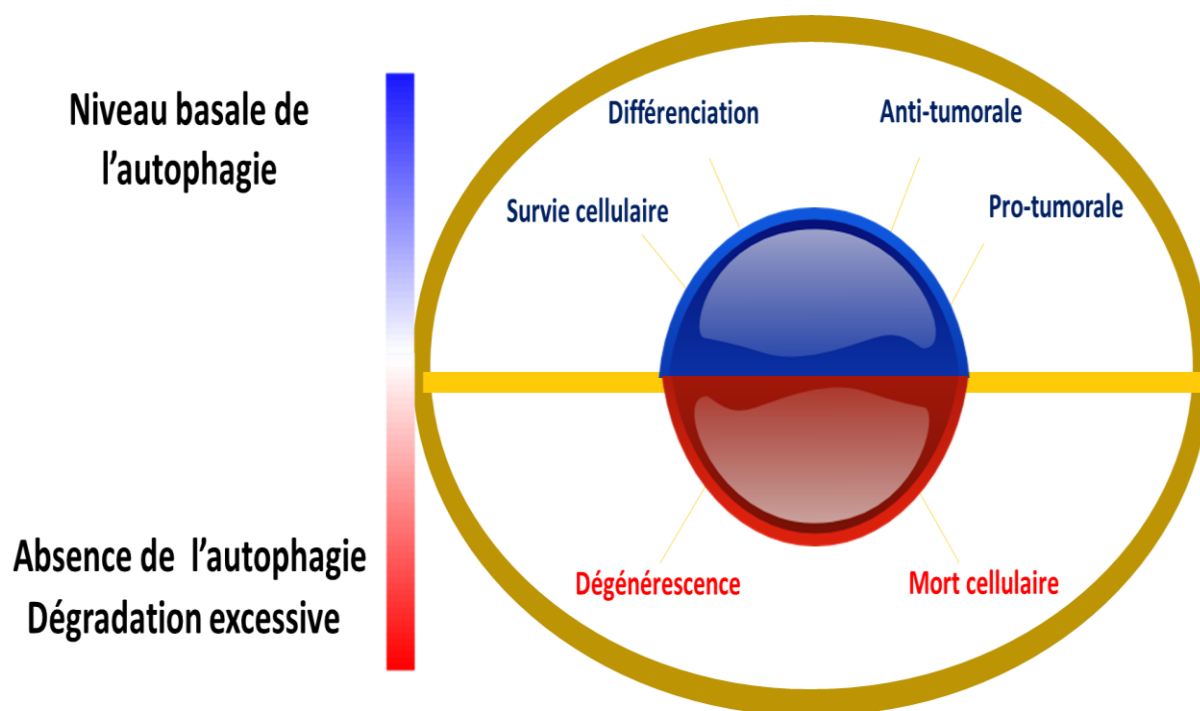


Figure 26 : autophagie : une voie d'homéostasie cellulaire entre la survie et la mort cellulaire

Dans les cellules normales, le niveau basal de l'autophagie est important pour assurer le développement, la différenciation et la défense des cellules contre le développement tumoral. En effet, l'absence ou la présence excessive de l'autophagie induit la tumorigénèse, la mort cellulaire et la dégénérescence cellulaire

V.4. La différenciation mégacaryocytaire et l'autophagie :

La relation entre l'autophagie et la différenciation mégacaryocytaire reste ambiguë. Plusieurs équipes ont montré le côté indispensable de l'autophagie dans la différenciation mégacaryocytaire. En 2009, une première étude par Colosetti et al., a montré que l'inhibition de l'autophagie suite au knock-down des facteurs clés de l'autophagie, bécline-1 et LC3 dans les cellules de leucémies myéloïdes chroniques K562 différenciées par PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), réduisait fortement la différenciation mégacaryocytaire. Ultérieurement, d'autres auteurs ont montré que le knock-out d'un gène clés de l'autophagie « Atg7 » dans les cellules souches hématopoïétiques inhibe fortement la différenciation mégacaryocytaire. Ils ont observé une diminution de la taille des mégacaryocytes et une abrogation du cycle cellulaire ainsi que l'activité mitochondriale. Ils ont montré que l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) induit l'accumulation des mitochondries en absence de l'autophagie. Cette inhibition est accompagnée d'une augmentation du pourcentage des cellules apoptotiques en comparaison avec les cellules différenciées Cette étude est vérifiée plus tard en 2017, par



Wang et al., sur les cellules de foie fœtal. Ils ont signalé que l'effet modulateur de l'autophagie par bafilomycine A1 et rapamycine n'aboutit qu'à la repression de la différenciation mégacaryocytaire dans les stades précoces de la différenciation. Tandis que dans les stades avancés, la modulation de l'autophagie n'a aucune conséquence sur la maturation des mégacaryocytes. Contrairement à l'étude précédente, une étude dirigée par Sun et al. en 2020 a montré que l'activation de l'autophagie par la rapamycine dans les cellules Dami (lignée mégacaryoblastique) différenciées par TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) augmente l'endomitose. D'un autre côté, l'inhibition de l'autophagie par la bafilomycine A1 dans ces cellules inhibe l'endomitose des futurs mégacaryocytes. Avant notre étude, le rôle de l'autophagie dans la différenciation mégacaryocytaire induite par la diosgénine dans les cellules HELs n'a pas été étudié dans la littérature.



Chapitre VI : Un stéroïde végétal : la diosgénine.

VI.1. Diosgénine

La diosgénine (Dios) [(25R)-5-spirosten-3 β -ol] est une sapogénine à noyau stéroïdique, constituée du noyau spirostane seul et ne présente pas de partie glucidique ramifiée en C3 (386). Cette molécule est extraite des plantes médicinales de la famille des *Dioscorea* (*Dioscorea batatas* connu comme l'igname de Chine) (387) et des plantes comme le fenugrec (*Trigonella foenum graecum*) (388) (**Figure 27**). L'intérêt de la diosgénine dans l'industrie pharmaceutique est connu depuis des années. Les corticostéroïdes et les hormones sexuelles décrites pour leurs effets thérapeutiques sont obtenus de manière semi-synthétique à partir de la diosgénine (389). L'effet thérapeutique de la diosgénine est exhaustivement décrit dans la littérature en tant qu'anti-infectieux (390), anti-inflammatoire (391), anti-cancéreux (13), anti-diabétique (392). Comme anti-cancéreux, la diosgénine présente des effets cytotoxiques sur différents types de cellules cancéreuses (cancer du sein (393), de la prostate (394), leucémies (13), du colon (395), gastrique (396, 397)). De nombreuses études ont montré l'effet inhibiteur de la diosgénine sur la migration et l'invasion des cellules cancéreuses par exemple les cellules PC3 du cancer de prostate (394). En revanche, peu d'études montrent l'effet cytotoxique de la diosgénine sur les cellules leucémiques (398). Selon les travaux de Liu et al. en 2004, la diosgénine induit l'apoptose des cellules K562 en induisant l'arrêt du cycle cellulaire suite à l'inhibition de cycline B1, cdc2 et p21. De plus, le pourcentage des cellules K562 en sub-G1 du cycle cellulaire augmente suite au traitement ainsi que la fragmentation d'ADN et l'exposition de la phosphatidylsérine du côté externe de la membrane cellulaire (399). En 2014, Jiang et al. ont validé le fait, qu'à côté de l'effet antiprolifératif, l'augmentation de la dose de diosgénine induit une augmentation du flux autophagique. L'utilisation des inhibiteurs de l'autophagie tels que la 3-MA (3-méthyladénine) et la chloroquine accélère l'effet apoptotique de la diosgénine (400). Ceci confirme que l'autophagie est une voie de survie cellulaire visant à contrecarrer l'apoptose dans ce cas.

Depuis une quinzaine d'années, Leger et al. ont montré que la diosgénine (40 μ M) induit l'inhibition de la prolifération ainsi que l'apoptose des cellules HELs en démontrant l'implication des voies p38, ERK, JNK, NF- κ B et PI3K/Akt, ainsi que des ef-



facteurs clés de l'apoptose (activation de la caspase-3 et clivage de la PARP) (401). Récemment en 2016, Jiang et al. ont montré l'effet apoptotique de la diosgénine sur les cellules de LMC K562 en démontrant que l'inhibition de l'autophagie accélère cet effet pro-apoptotique (402).

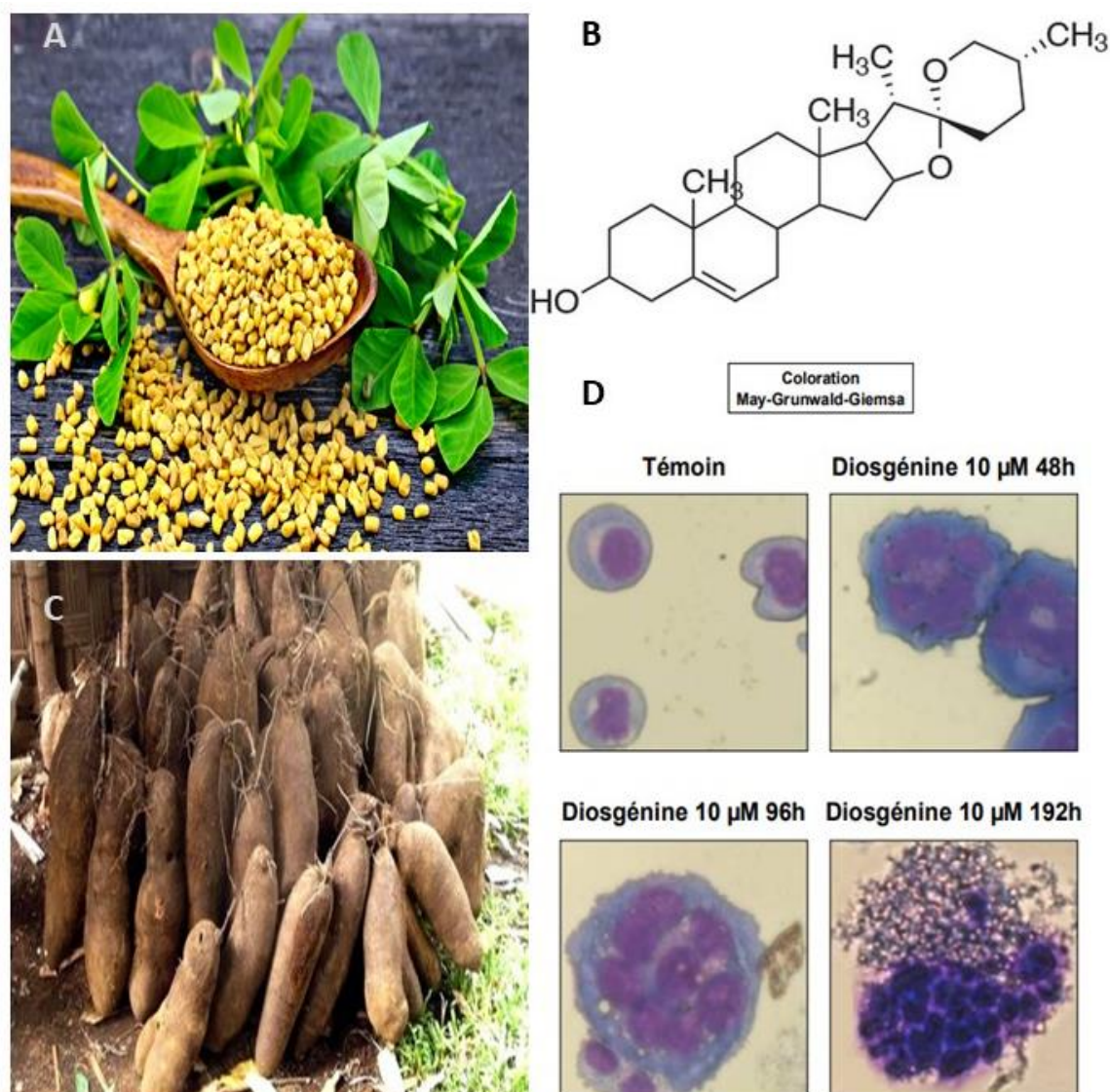


Figure 27 : structure et effet de la diosgénine

A- grains de fenugrec, B- structure chimique de la diosgénine, C- tubercules d'ignames et D- différenciation mégacaryocytaire induite par 10 μ M de diosgénine pendant 192h (403).

VI.2. La différenciation mégacaryocytaire et diosgénine :

En 1995, Beneytout et al. ont montré que la différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL était induite par la diosgénine. En effet à l'aide d'une dose-réponse, ces auteurs ont remarqué que seule la dose de 10 μ M de diosgénine induisait des changements dans la structure des cellules devenant de plus grande taille et exprimant



des marqueurs caractéristiques de la différenciation (GpIB) (404). Une dizaine d'années plus tard, Leger et al. au sein de notre laboratoire ont étudié à nouveau cet effet sur les cellules HEL afin de mieux décrire l'induction de la différenciation mégacaryocytaire sur le plan moléculaire. Ils ont montré que les cellules HEL différenciées par 10 μ M de diosgénine augmentent progressivement la taille jusqu'à la maturation finale. Selon leurs résultats, il y avait une augmentation de l'expression génomique de glycoprotéine V, glycoprotéine IX, CD41⁺, CD61⁺, CD62⁺. En parallèle, ils ont montré que le contenu en ADN (la polyploïdie) augmentait progressivement jusqu'à la fin de la différenciation mégacaryocytaire. Ensuite, ils ont examiné les voies moléculaires impliquées. Ils ont observé une stimulation de l'expression de Bcl-2 au début de la différenciation mégacaryocytaire. En outre, il a été observé une augmentation de l'activité NF- κ B et la phosphorylation d'Akt et l'activité de p-ERK et à ce stade. Au fur et à mesure de la progression de la différenciation, l'expression et l'activité de ces protéines diminuaient. En plus, ils ont confirmé la théorie de Botton et al. (304) en montrant qu'au cours de la différenciation l'activité de caspase-3 augmentait soudainement à 48h avant de reprendre un niveau basal. À partir de 96h de la différenciation, l'activité de caspase 3 augmentait avec une induction du clivage de la PARP jusqu'au terme de la différenciation mégacaryocytaire (13,401,405) (**Figures 27, 29**). Dans la littérature, peu sont les travaux qui étudient la différenciation mégacaryocytaire induite par des molécules naturelles (51,406).

Toujours au sein de notre laboratoire, Ghezali et al. ont montré qu'il y avait une inhibition de la voie sonic hedgehog (SHh) corrélée avec la progression de la différenciation mégacaryocytaire induite par la diosgénine. Les résultats montrent que l'inhibition de cette voie inhibe la polyploïdisation ainsi que l'activité d'p-ERK qui est normalement élevée pendant les premières 24h de l'induction de la différenciation mégacaryocytaire (407).

L'effet de la diosgénine sur les cellules HEL repose sur un effet dose-dépendant car des doses supérieures à 10 μ M inhibent également l'arrêt de la prolifération de ces cellules mais avec la mise en place d'un processus apoptotique et non plus différenciant (401).



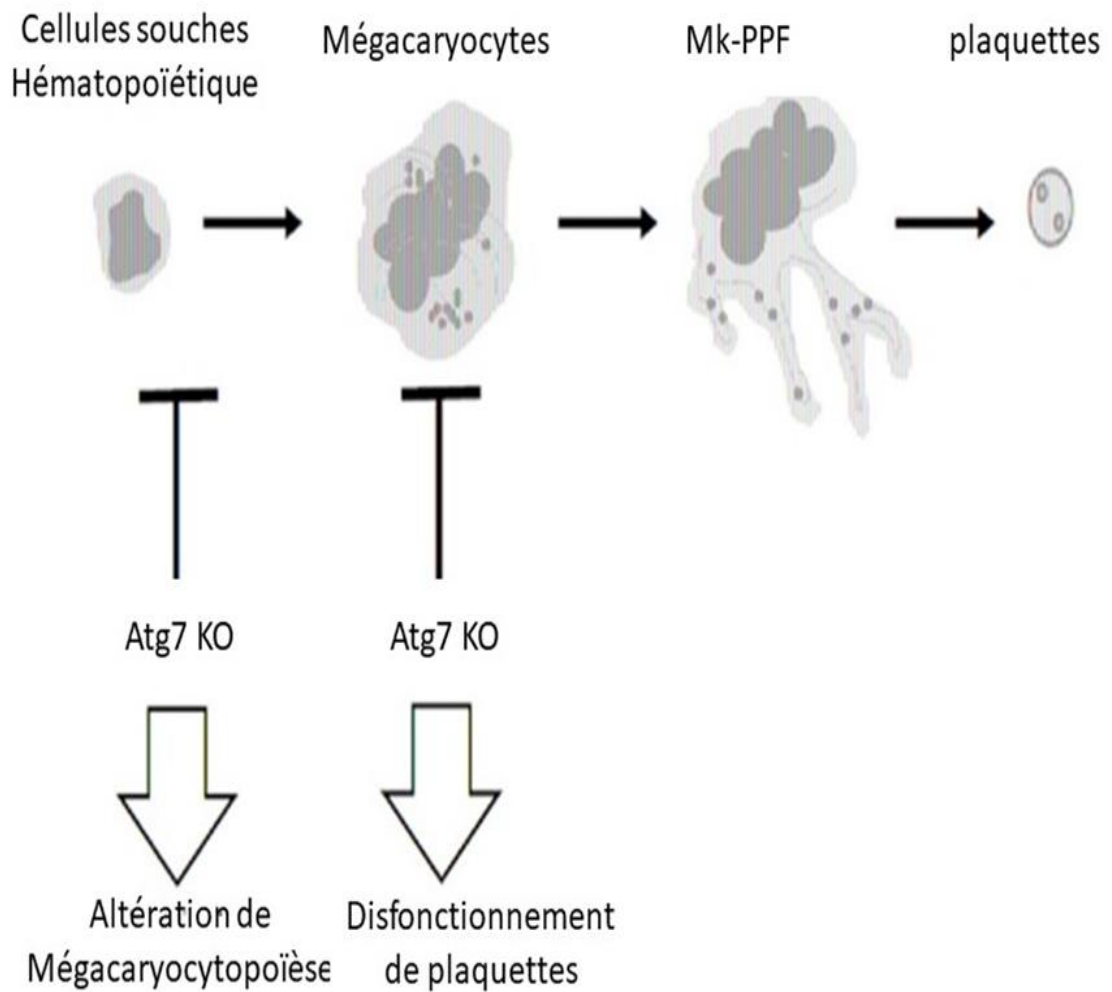


Figure 28 : inhibition de l'autophagie les cellules souches hématopoïétique inhibe la différenciation mégacaryocytaire. MK-PPF : proplatelet forming megakaryocytes (362).



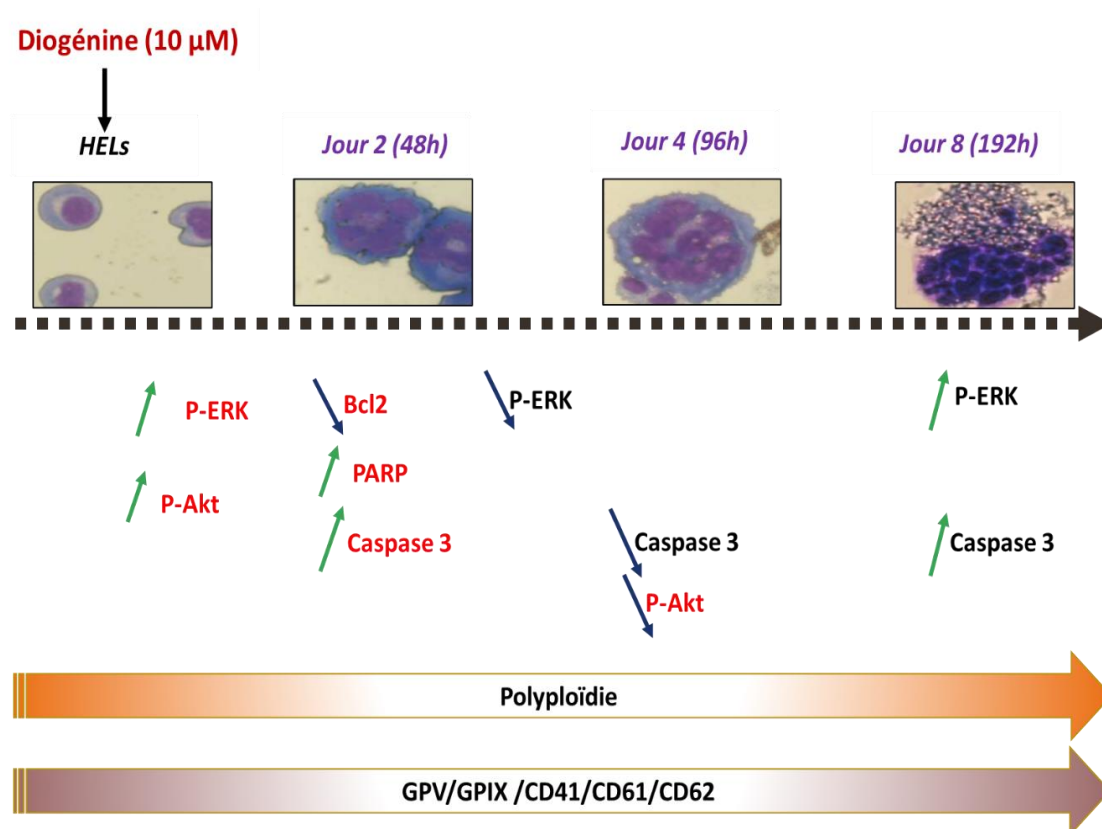


Figure 29 : voies moléculaires impliquées durant la différenciation mégacaryocytaire (403).

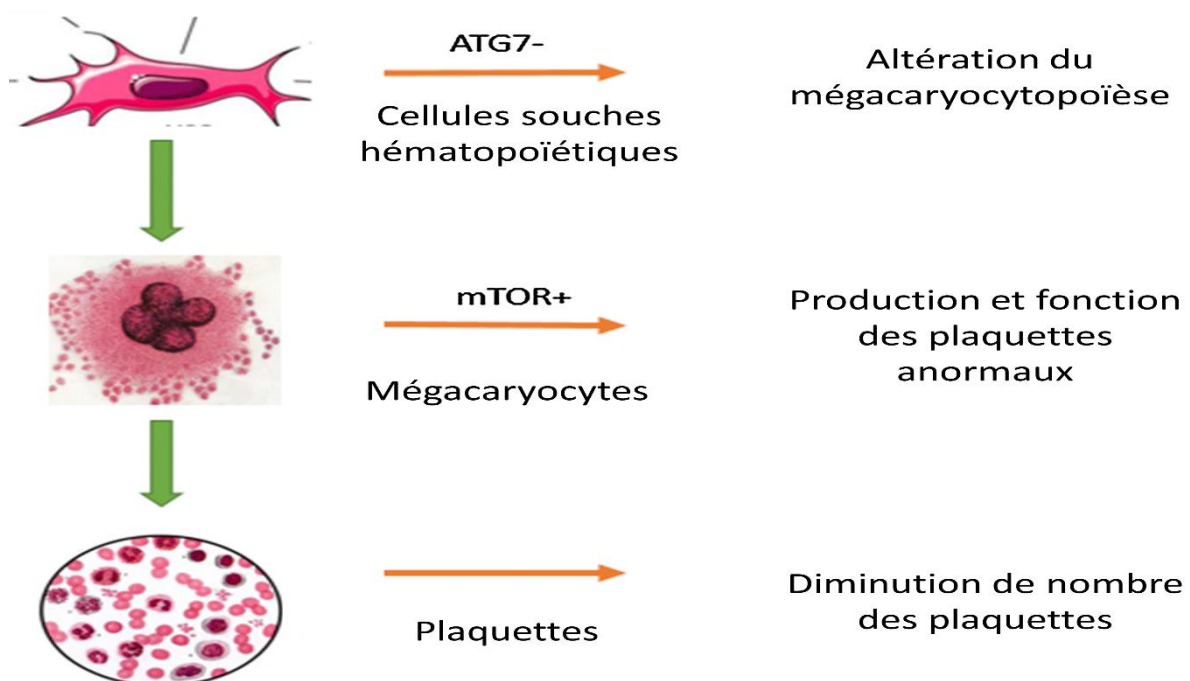


Figure 30 : surexpression de mTOR inhibe l'autophagie dans les mégacaryocytes et provoque l'altération de la production et de la fonction des plaquettes (384).



Projet de recherche

Les traitements actuels des leucémies se basent sur l'utilisation de la chimiothérapie et la greffe de cellules souches hématopoïétiques (408). Au regard des effets secondaires incontournables de ces traitements, les recherches récentes montrent l'importance de la thérapie de différenciation comme une solution alternative. Différentes molécules chimiques ou naturelles ont été utilisées pour induire la différenciation des cellules leucémiques particulièrement les cellules de leucémies myéloïdes aiguës (LMA) (409,410). On cite parmi eux l'acide rétinoïque (411), les esters de phorbol (412), certains inhibiteurs des histones désacétylases (210,413), la vitamine D₃ (414) et ses analogues.

Dans notre laboratoire, des résultats précédents ont montré que la différenciation mégacaryocytaire des HELs, lignée érythroleucémique, est induite par 10µM d'un stéroïde végétal nommé la diosgénine (401,404). La maturation nucléaire de ces cellules se traduit par une polyploïdie marquante (64N en contenu d'ADN). En outre, la maturation membranaire se manifeste par l'apparition et l'augmentation de l'expression de récepteurs caractéristiques des mégacaryocytes tout au long de leur maturation (13,415). Suite à la formation des membranes de démarcation pour donner les futures plaquettes, la maturation se termine par la fragmentation des mégacaryocytes et la libération de pseudo-plaquettes dans le milieu de culture (117).

Notre laboratoire a montré l'implication de l'apoptose durant la différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL induite par la diosgénine (13) et notamment lors des étapes finales conduisant à la libération des pseudo-plaquettes. De point de vue transduction de signal, les voies de signalisation régulant la différenciation sont mutuelles avec une autre voie de mort cellulaire programmée nommée l'autophagie (13,365). Récemment, les études montrent l'implication de l'autophagie et son importance dans ce processus mais le rôle de cette voie reste mal défini durant la maturation mégacaryocytaire (380,381,416).

Mon projet de recherche au cours de cette thèse a été de démontrer l'implication de l'autophagie durant la différenciation mégacaryocytaire induite par 10 µM de diosgénine, et sa possible interaction avec l'apoptose.



Le premier objectif a été d'analyser l'expression des différents effecteurs clés de l'autophagie durant la différenciation mégacaryocytaire induite par la diosgénine. Au regard des résultats obtenus, la stratégie du deuxième objectif a reposé sur l'inhibition de l'autophagie par la 3-méthyladénine ou sur son activation par la metformine avant et après l'induction de la différenciation mégacaryocytaire des HELs. De ce fait, la démarche a été de comprendre l'effet de la modulation de l'autophagie sur la maturation membranaire et nucléaire des cellules HELs ainsi que sur la fragmentation d'ADN.





I. LIGNÉE CELLULAIRE :

La lignée HEL provient de l'American Type Culture Collection (ATCC) et nous a été gracieusement fournie par le Pr. J.P. Cartron (INSERM U76, Paris). Cette lignée a été obtenue en cultivant des cellules mononucléées du sang circulant d'un malade qui présentait une érythroleucémie après rémission d'une maladie de Hodgkin (417).

Les cellules HELs sont ensemencées en flacons de culture de 75 cm² dans du milieu RPMI-1640 (GibcoBRL) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, GibcoBRL), 1% de glutamine (2 mM, GibcoBRL), 1% de HEPES (10 mM, GibcoBRL) et 1% de pyruvate de sodium (1 mM, GibcoBRL) et 1% de streptomycine pénicilline (100 U/ml et 100 µg/ml, GibcoBRL).

Les cellules ensemencées sont placées dans un incubateur à 37°C en atmosphère humide (95%) et sous 5% de CO₂. Les numérations des cellules viables sont réalisées sur cellule de Malassez par le test d'exclusion au bleu de trypan (Sigma) (les cellules blanches étant viables).

II. TRAITEMENTS :

Pour toutes les expériences réalisées, les cellules sont ensemencées à une densité de 10⁵ cellules/ml de milieu (10⁶ cellules/10 ml de milieu de culture). La concentration cellulaire doit être maintenue entre 10⁵ et 10⁶ cellules par ml.

La différenciation mégacaryocytaire est induite suite au traitement des cellules HEL avec la diosgénine. Après un jour d'ensemencement, les cellules sont traitées avec une solution mère de diosgénine à 10⁻² M en solution éthanolique pour arriver à une concentration finale de 10 µM dans le flacon de culture de 75 cm².

Les cellules témoins sont traitées par le même volume d'éthanol (<0,1%) que pour les conditions traitées par la diosgénine.

La modulation de l'autophagie se fait suite au traitement des cellules par les molécules 3-MA et Met (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) respectivement avec des concentrations finales de 2 mM et 0,25 mM.

Le choix de temps de traitement est basé sur les résultats de Leger et al. publiés entre 2004 et 2007 au sein de notre laboratoire ainsi que les études précédentes élaborant la relation entre l'autophagie et la différenciation mégacaryocytaire (Chapitre V.4, VI.2) (13,401,415).



On a adopté deux stratégies de traitement pour moduler l'autophagie avant et après l'induction de la différenciation mégacaryocytaire des HELs par 10 μ M de diosgénine :

1- Les cellules sont pré-traitées avec la 3-MA ou la Met 2 h avant l'induction de la différenciation par 10 μ M de diosgénine.

2- Les cellules sont traitées par la 3-MA et la Met après l'induction de la différenciation par 10 μ M de diosgénine. On a modulé l'autophagie au jours 2 et 4 de la différenciation.

Pour effectuer les différentes expériences les cellules sont récupérées aux jours 2, 4 et 8 de la différenciation.

III. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES PROTÉINES PAR WESTERN BLOT :

Les cellules sontensemencées dans des flacons de culture de 75 cm² selon la densité déterminée auparavant. Après 24h de prolifération, les cellules sont traitées ou non par 10 μ M de diosgénine. Les cellules sont ensuite récupérées après 1, 2, 4, 6 et 8 jours de traitement, centrifugées et lavées en tampon PBS 1X. La numération des cellules viables a été réalisée sur cellule de Malassez par le test d'exclusion au bleu trypan (Sigma) (les cellules blanches étant viables).

Les culots cellulaires ont été congelés à -80°C si nécessaire.

1. L'extraction des protéines :

Les cellules sont lysées dans du tampon RIPA (HEPES 50 mM pH=7,5 ; déoxycholate 1% ; Nonidet P-40 1% ; SDS 0,1% ; NaCl 150 mM ; aprotinine 20 μ g/ml) contenant 40 μ l/ml d'une solution d'inhibiteurs de protéases (Complete®, Roche Diagnostics). Les lysats sont récupérés par centrifugation (12000 rpm, 20 min à 4°C) et placés dans la glace ou à -80°C avant de déterminer la concentration protéique par la technique colorimétrique de Bradford utilisant le bleu de Coomassie (Bio-Rad). La lecture au spectrophotomètre à 595 nm est effectuée contre une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA : 0 à 2 μ g/ml).

2. L'expression des protéines

Les protéines totales (40 à 70 μ g) sont mélangées à un volume identique de tampon d'échantillon 2X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8 ; SDS 2% ; glycérol 10% ; dithiothréitol 100 mM ; Bleu de Bromophénol 0,1%), puis dénaturées 5 min à 95°C. Les protéines sont ensuite séparées sur un gel d'électrophorèse dénaturant (SDS-PAGE) (10 à 12



% selon les protéines). La migration s'effectue pendant 2h (90 V) dans le tampon de migration (Tris-HCl 25 mM pH 8,5 ; glycine 250 mM ; SDS 0,1%). Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (polyvinylidène difluoride) (Amersham Pharmacia Biotech) préalablement trempée quelques secondes dans du méthanol avant d'être rincée à l'eau puis équilibrée quelques min dans du tampon de transfert (Tris 48 mM ; glycine 39 mM ; méthanol 20% ; SDS 0,03% ; pH= 8,1-8,5). Le gel de polyacrylamide est également équilibré quelques min dans le tampon de transfert avant d'être mis en contact avec la membrane selon les instructions du fabricant (Invitrogen). Le transfert s'effectue pendant 1h 30 (20 V, 100 mA). Après lavages en tampon TBS 1X-Tween 0,1%, la membrane est incubée pendant 1 h à température ambiante sous agitation avec du tampon de blocage (TBS 1X-lait 4% ou TBS 1X-BSA 5%) afin de saturer les sites aspécifiques. Après avoir éliminé le tampon de blocage, les membranes sont lavées brièvement avant d'être incubées une nuit à 4°C sous agitation avec les anticorps primaires dilués dans le tampon de blocage. Après incubation, les membranes sont lavées plusieurs fois dans du tampon TBS 1X-Tween 0,1% avant d'être incubées avec les anticorps secondaires polyclonaux anti-IgG correspondants conjugués à une peroxydase : anticorps secondaire anti-IgG de souris (1/5000, Dako) ou de lapin (1/2000, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific (Villebon-sur-Yvette, France)). La révélation des complexes antigène-anticorps spécifiques se fait sous agitation douce 1h à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire dilué dans le tampon de blocage. Les membranes sont ensuite lavées dans le tampon de lavage afin d'éliminer l'excès d'anticorps secondaire. La révélation est réalisée par une réaction de chimiluminescence en utilisant le système Immobilon (Substrat HRP Immobilon Western, Merck Millipore) et le système G : BOX (Syngene, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). Le poids moléculaire des bandes spécifiques ainsi révélées est déterminé grâce à la migration de marqueurs de poids moléculaires connus (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific). L'intensité relative des bandes a été déterminée grâce au logiciel de traitement d'images ImageJ et la GAPDH a été utilisée comme protéine de référence.

Les anticorps monoclonaux de souris ou de lapin sont dirigés contre différentes protéines humaines :



Protéines	Source	Dilution	Fournisseurs
Becline-1	Lapin	1/1000 ^{ème}	Cell signaling
Atg7	Lapin	1/1000 ^{ème}	Cell signaling
Atg12-5	Lapin	1/1000 ^{ème}	Cell signaling
Atg3	Lapin	1/1000 ^{ème}	Cell signaling
LC3A/B-I/-II	Lapin	1/1000 ^{ème}	Cell signaling
GAPDH	Souris	1/100 ^{ème}	Santa cruz Bio-technology

IV. ANALYSE DE LA QUANTITÉ D'ADN (NIVEAU DE PLOÏDIE) PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX :

Les cellules HEL sontensemencées à une densité de 10⁵ cellules/ml de milieu de culture, cultivées pendant 24h puis traitées par la Dios 10 µM pendant 8 jours. Les cellules sont ensuite récupérées après 1, 2, 4 et 8 jours de différenciation, centrifugées et lavées une fois en PBS 1X. 2x10⁶ cellules sont placées dans un nouveau tube, centrifugées, perméabilisées et fixées par l'addition de 1 ml d'éthanol à 50% (pendant une nuit à -20°C) ou par 1 ml d'éthanol à 70% (pendant une semaine à -20°C). Après cette étape, les cellules sont récupérées par centrifugation avant d'être lavées deux fois en PBS froid, puis reprises dans 500 µl de PBS froid contenant de la RNase A (40U/ml), et incubées 20 min à température ambiante. Une solution mère de RNase A à 100 mg/ml (Roche diagnostics, 40 U/mg, Boehringer Mannheim, Meylan, France) est préparée préalablement dans du tampon Tris (Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 ; NaCl 0,1 M) ne contenant pas de DNase (la DNase résiduelle a été éliminée par chauffage à 100°C pendant 20 min). Les cellules sont ensuite marquées à l'iodure de propidium (IP, 50 µg/ml, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific (Villebon-sur-Yvette, France)) juste avant analyse.

Les analyses sont effectuées par cytométrie en flux à l'aide d'un analyseur trieur BD FacsCalibur (Becton Dickinson, USA). Les résultats sont présentés sous forme de cytogramme : pic du signal de fluorescence (FL3, fluorescence de l'IP) en fonction du nombre de cellules passées. Un minimum de 10⁵ cellules/ml est analysé avec une vitesse de passage de 300 cellules/s. L'analyse de la distribution des cellules dans les différents niveaux de ploïdie (cycle cellulaire normal et polyploïdisation) est réalisée à



partir des cytogrammes précédents avec le logiciel CellQuest™pro version 6.0 (BD, USA). Les résultats pourraient alors être également présentés sous forme d'histogrammes indiquant le pourcentage de cellules dans les différents niveaux de ploïdie.

V. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE L'ARNm DE GPV (GLYCOPROTÉINE V), UN MARQUEUR DE DIFFÉRENCIATION MÉGACARYOCYTAIRE.

V.1. Extraction des ARNs totaux.

Les ARNs totaux sont extraits des cellules HEL traitées ou non par 10 μ M de diosgénine.

L'extraction des ARN totaux est réalisée suite à la récupération des cellules après 1, 2, 4, 6 et 8 jours de différenciation sur colonne à partir du kit RNeasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fabricant. Environ 2×10^6 cellules sont récupérées, centrifugées, lavées deux fois au PBS 1X froid et de nouveau centrifugées. Le culot cellulaire est lysé par 350 μ l de tampon de lyse RLT. Ce tampon contient un détergent à haute concentration, un agent dissociant et de l'isothiocyanate de guanidine afin d'inhiber les RNases. Ce tampon est complété par de l'éthanol et du β -mercaptoéthanol selon les instructions du fabricant. Après ajout d'un volume d'éthanol à 70% (350 μ l), le lysat est homogénéisé à la pipette automatique puis transféré sur une colonne. Cette colonne comporte une membrane constituée par un gel de silice qui va retenir les ARNs. La colonne est alors centrifugée (8000 g, 15 s à température ambiante) et ce qui n'a pas été retenu par le gel de silice est éliminé. La colonne est alors transférée sur un tube propre et lavée une fois dans du tampon RW1 contenant de l'éthanol et deux fois dans du tampon de lavage RPE par centrifugation 15 s à 8000 g. La membrane est ensuite séchée par centrifugation 2 min à 8000 g. Les ARNs sont ensuite élués par de l'eau stérile dépourvue de RNase à partir de la membrane de silice par centrifugation 1 min à 8000 g. La qualité de l'extraction ainsi que la quantité d'ARN ont été évaluées par mesure spectrophotométrique en utilisant le Bio-photometer (Eppendorf). On commence la mesure en passant le blanc (eau distillée, 500 μ L) puis après on passe les échantillons (2 μ l) dilués dans 500 μ l d'eau distillée afin d'obtenir une dilution au 1/2.

Les ARNs totaux sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

V.2. Analyse de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation mégacaryocytaire :



Afin d'analyser l'expression de la GpV (Glycoprotéine V), les ARN totaux purifiés de la première étape vont subir la transcription inverse afin d'obtenir des ADNc. La transcription inverse est réalisée en utilisant le kit « Omniscript RT kit » (Qiagen).

La quantité d'ARN à transcrire doit être comprise entre 0,5-2µg reflétant ainsi la haute affinité et sensibilité du kit.

Le mix établi pour chaque tube réactionnel est formé de : enzyme omniscript transcriptase inverse (4U/µl), tampon de RT (10X), dNTP (5 mM, Invitrogen), l'oligo dT (0.5 µg, Invitrogen, Cergy pontoise, France,) et inhibiteur de RNase (10 U/µl, Invitrogen).

La manipulation est réalisée à 4°C. Les échantillons d'ARN sont mélangés avec de l'eau dépourvue en RNase avec un volume maximal de 13 µl.

Les échantillons sont placés dans le thermocycleur afin d'accomplir la réaction selon le programme suivant : 37°C sur 1 cycle d'1h, 5 min à 93°C, 4°C en pause.

V.3. Polymerase Chain Reaction (PCR), Analyse de l'expression génomique de GpV :

La PCR est une technique semi-quantitative permettant de détecter l'expression génomique d'un gène d'intérêt. Le simple brin d'ADNc obtenu par reverse transcription est amplifié par réplication en double brin d'ADN.

On vise à voir l'expression génomique de GpV en utilisant GAPDH comme contrôle interne. Les amorces utilisées pour amplifier un amplicon de l'ADNc de la GpV sont :

Sens : 5'-CAC GAA TCT GGA GAA CCT GAA GTT G-3'

Anti-sens : 5'-CAA CAG AGT CAG ATT GTG CGA ATG-3'

Chaque ADNc est amplifié selon un nombre de cycle spécifique déterminé préalablement : GpV : 30 cycles et GAPDH : 30 cycles

La réaction de PCR est préparée à l'aide du kit « Hot start taq DNA polymérase » (Qiagen).

Chaque tube réactionnel est constitué de : tempon 10X, MgCl₂ (25 mM), dNTP (10 mM), d'oligonucléotide sens (20 µM), d'oligonucléotide anti-sens (20 µM), Hotstar Taq DNA polymérase, eau distillée et d'ADNc de chaque échantillon. Ensuite, les tubes réactionnels sont placés dans le thermocycleur et suivront le programme ci-dessous : activation de la Taq Polymérase 15 min à 95°C et 29 cycles : 45 s à 94°C (dénatura-



tion), 45 s à 65°C (hybridation), 1 min à 72°C (elongation) et une étape finale de terminaison de 10 min à 72°C.

VI. ANALYSE QUALITATIVE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN.

L'ADN amplifié est alors stocké à 4°C avant d'être visualisé après électrophorèse en tampon Tris-borate-EDTA 0,5 X ou TBE (Tris-HCl : 10 mM pH 7,4 ; Borate : 1 mM ; EDTA : 1 mM) sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium (BET). Les tailles des fragments estimées à l'aide de marqueurs de poids moléculaires (échelle de 100 pb, Invitrogen) sont comparées aux tailles des fragments théoriquement attendues. L'ADN amplifié sera visualisé par le système G : BOX (Syngene, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) et l'acquisition de l'image se fait par le logiciel (Genesnap version 7.09). L'intensité relative des bandes de gène d'intérêt et du GAPDH (contrôle interne) ont été déterminés grâce au logiciel de traitement d'images ImageJ.

Les cellules HEL sontensemencées en flacon de culture de 75 cm² à une densité de 10⁵ cellules/ml. Après 24 h de prolifération, les cellules sont traitées ou non par 10 µM de diosgénine pendant 8 j. Les culots cellulaires récupérés après 1, 2, 4 et 8 j de différenciation sont alors repris dans du tampon de lyse (200 µL/10⁵ cellules) et incubés 30 min à température ambiante. La fragmentation de l'ADN est alors quantifiée par le kit « Cell Death Detection ELISA^{PLUS} » (Roche Diagnostics). Après centrifugation (10 min à 200 g), les lysats cellulaires sont déposés dans les puits d'une plaque d'analyse recouverts de streptavidine. Un mélange d'anticorps anti-histone biotinylé et d'anti-ADN conjugué à une peroxydase est ensuite ajouté dans les puits. Au cours de l'incubation (2 h sous agitation), les mono- et les oligo-nucléosomes formés lors de la fragmentation de l'ADN sont complexés avec les Ac anti-histone, eux-même capturés au fond des puits par la streptavidine. De plus, les Ac anti-ADN réagissent avec l'ADN nucléosomique. Après lavages, une solution d'ABTS (2,2'-azino-di- [3- éthylbenzothiazoline sulfonate]), substrat de la peroxydase, est ajoutée dans les puits. Au cours de l'incubation (15 min sous agitation à température ambiante), une réaction colorimétrique se développe entre l'ABTS et la peroxydase portée par les Ac anti-ADN.

La quantité d'ABTS oxydé correspondant à la quantité d'ADN fragmenté est mesurée à 405 nm à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA. Le blanc de lecture est représenté par la solution d'ABTS (longueur d'onde de référence 490 nm). Chaque condition est testée trois fois et les valeurs moyennes d'absorbance (405 nm-490 nm) sont



ensuite déterminées pour chaque échantillon et comparées aux valeurs obtenues pour les contrôles cellulaires (cellules non traitées).

VII. ANALYSE STATISTIQUE

Tous les résultats quantitatifs sont exprimés comme la moyenne $\pm$ l'erreur type de la moyenne (SEM) d'analyses distinctes. La significativité statistique a été évaluée grâce au test de Student bilatéral non-apparié et exprimée selon *, #p <0,05. Toutes les expériences ont été réalisées au moins 3 fois.



Résultats

I. Expression des facteurs clés de l'autophagie pendant la différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL induite par la diosgénine (Dios) 10 μ M.

Les cellules érythroleucémique humaine HEL sontensemencées à 10^5 cellules/ml de milieu de culture frais. Après 24h d'ensemencement, les cellules sont traitées par 10 μ M de diosgénine (Dios). Les cellules se différencient pendant 8 jours et la taille des cellules augmente avec la progression de la différenciation (**Figure 31**). Afin d'examiner l'expression des effecteurs clés de l'autophagie (becline-1, Atg7, Atg3, Atg12-5, LC3A/B-I et LC3A/B-II) les cellules sont récupérées le 1^{er}, 2^{ème}, 4^{ème} et 8^{ème} jour après l'induction de la différenciation mégacaryocytaire des HELs. La sélection de ces temps a été faite en se basant sur les résultats obtenus au laboratoire et publiés par Leger et al. en 2006 (13,398,415) :

- **Au premier jour de différenciation** : on note un changement de la morphologie de noyau des cellules, un début de polyploïdisation (8N) et de la maturation membranaire (l'expression génomique de CD41⁺, CD62⁺ et GpV).
- **Au deuxième jour de différenciation** : la polyploïdisation(16N) et la maturation membranaire s'accélèrent avec un pic d'activité de caspase-3 et une modulation de plusieurs voies moléculaires (p-ERK1/2, p-Akt ; NF- κ B, Bcl-2, PARP)
- **Au quatrième jour de différenciation** : la majorité des cellules sont en 32N de ploïdie et les cellules géantes entre en plaquettogénèse.
- **Au huitième jour de différenciation** : les cellules sont en maximum de ploïdie (64N) et prêtes pour la fragmentation et libération des pseudo plaquettes par apoptose.



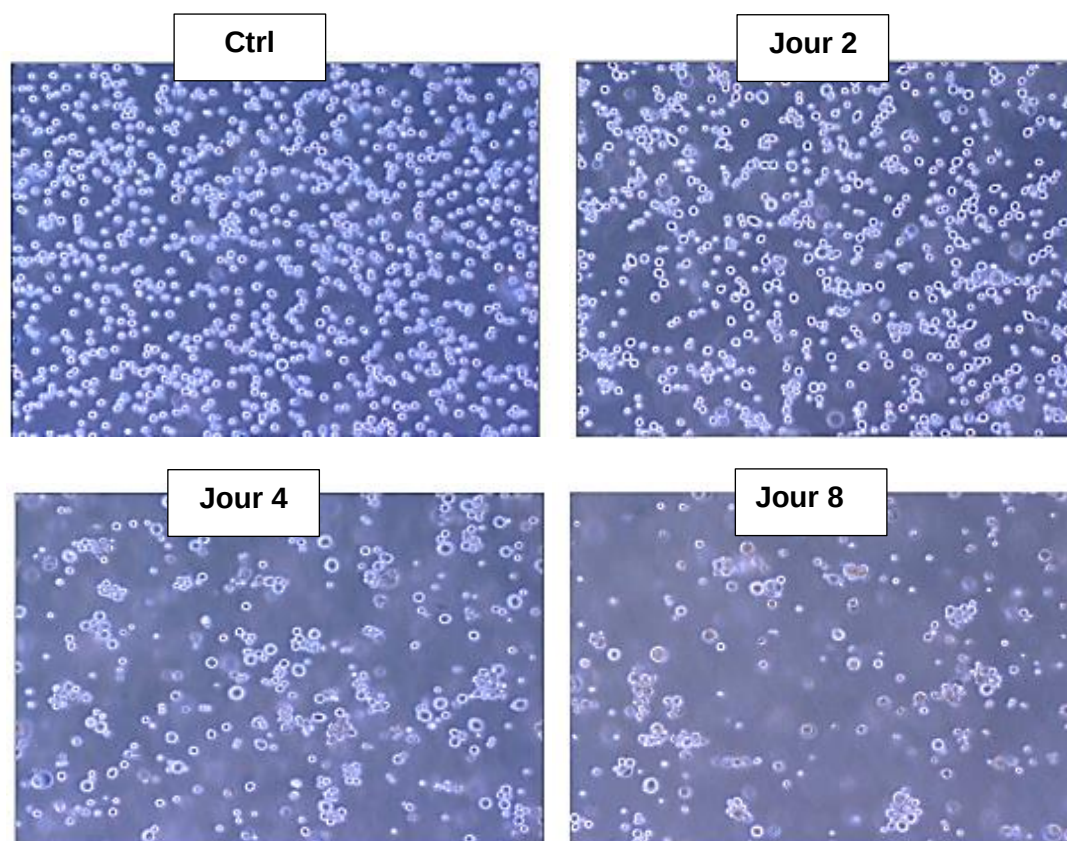


Figure 31 : l'aspect morphologique des cellules érythroleucémiques humaines (HEL) suite au traitement par 10 μ M de diosgénine pendant 8 jours en comparaison avec les cellules témoins.
Grossissement (x100).

À ces différents moments nous avons donc étudié les variations d'expressions des marqueurs clés de l'autophagie (**Figure 32**). Les résultats montrent une surexpression significative de Atg7 dès le premier jour après induction de la différenciation (x3,4 vs cellules témoins, *P<0,05). Cette surexpression continue jusqu'à la fin de la différenciation avec une élévation significative au jour 4 (x4,7 vs cellules témoins, *P<0,05), au jour 6 (x5,6 vs cellules témoins, *P<0,05) et au jour 8 (x4,3 vs cellules témoins, *P<0,05). Néanmoins, la modulation de l'expression de bécline-1 reste statistiquement insignifiante avec l'avancement de la différenciation.

Bien que Atg3 et Atg12-5 sont impliquées dans les systèmes de conjugaison de LC3A/B-I à la phosphatidyléthanolamine (LC3A/B-II), on n'observe aucune modulation dans leurs expressions. Cependant l'accumulation de la forme LC3-II commence dès le premier jour et devient significative aux jours 4 (x4,7 vs cellules témoins, *P<0,05) et 8 (x5,3 vs cellules témoins, *P<0,05).



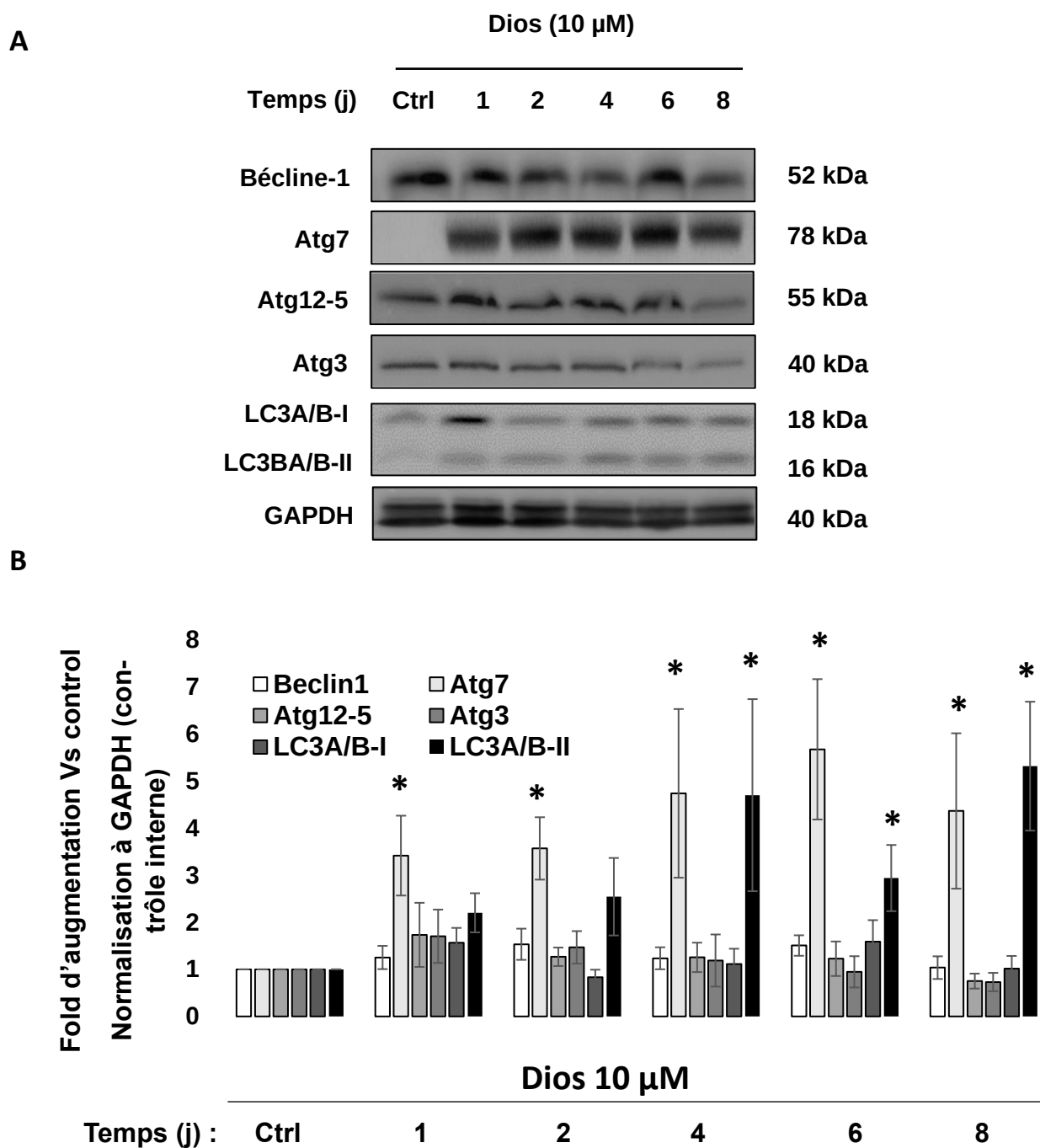


Figure 32 : L'expression des effecteurs clés de l'autophagie au cours de la différenciation mégacaryocytaire des HELs induite par la diosgénine.

(A) L'expression de bécline-1, Atg7, Atg12-5, Atg3, LC3A/B-I et LC3A/B-II a été évalué par western blot (GAPDH a été utilisé comme un contrôle interne, les blots sont quantifiés et les valeurs sont représentatives de trois expériences séparées). (B) l'augmentation de fold est exprimée sous forme des moyennes $\pm$ SEM (n=3). *P<0.05 vs groupe ctrl. Dios : diosgénine ; LC3A/B, light chain 3 A/B ; Ctrl, contrôle.



Tableau 3 : les folds d'expression en comparaison avec les cellules témoins traitées uniquement par l'éthanol (< 0.1%) (n=3 ; *P<0.05)

Protéines	Jour 1	Jour 2	Jour 4	Jour 6	Jour 8
Atg7	x 3,42	x 3,57	x 4,74	x 5,67	x 4,36
LC3-A/B-II			x 4.7	x 2.94	x 5,32

Ce résultat montre la stimulation du flux autophagique durant la différenciation mégacaryocytaire.

II. Effet de la modulation de l'autophagie sur l'expression des facteurs clés de l'autophagie au cours de la différenciation mégacaryocytaire des cellules HELs.

Afin de définir précisément le rôle de l'autophagie lors de la différenciation mégacaryocytaire, nous avons modulé cette voie avant et après le traitement des cellules HEL à la diosgénine. Nous avons utilisé deux molécules modulatrices de l'autophagie, la 3-méthyladénine (3-MA) et la metformine (Met). La 3-MA est un inhibiteur de l'initiation de l'autophagie en inhibant le complexe PI3K-complexe III. La metformine, quant à elle est un activateur de l'initiation de l'autophagie (axe AMPK). Deux stratégies ont alors été utilisées : une modulation en amont, avant l'induction de la différenciation par la diosgénine afin de vérifier si l'autophagie a un effet sur la différenciation débutant à court terme ou sur la maturation du mégacaryocyte à long terme. Dans ce cas le traitement modulateur (3-MA ou Met) est réalisé 2h avant le traitement des HELs par 10 μ M de diosgénine. En second lieu une modulation en aval, après induction de la différenciation par la diosgénine. Dans ce cas, le traitement modulateur est effectué aux jours identifiés préalablement comme étant importants dans le timing de la différenciation à savoir les jours 2 (stade précoce de différenciation) et 4 (les cellules ont atteint une teneur en ADN de 32N) après induction de la différenciation mégacaryocytaire.

Dans un premier temps nous avons vérifié l'effet des modulateurs de l'autophagie sur l'expression protéique des effecteurs clés de l'autophagie étudiés précédem-

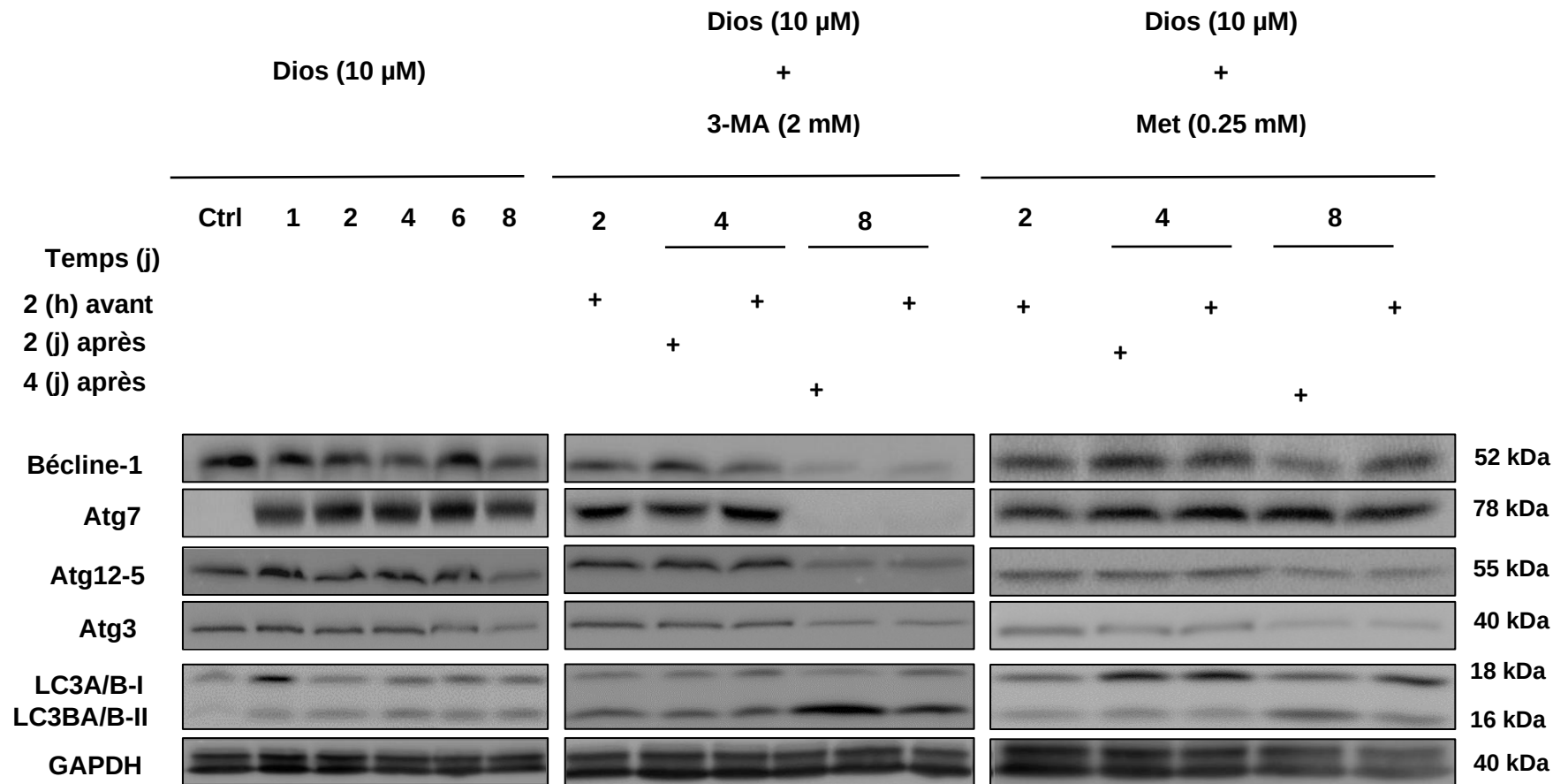


ment durant la différenciation mégacaryocytaire (Bécline-1, Atg7, Atg3, Atg12-5 et la conversion de la forme LC3A/B-I en LC3A/B-II). Comme l'illustre la **Figure 33**, l'inhibition de l'autophagie par le 3-MA (2 mM) avant ou après le traitement des HEL avec la diosgénine a inhibé l'expression de la protéine Atg7 mais pas bécline-1, Atg12-5 et Atg3. Aux jours 2 et 4, la réduction de l'expression d'Atg7 n'était pas statistiquement significative. Au jour 8, l'expression protéique d'Atg7 était significativement diminuée, que l'autophagie ait été inhibée 2h avant l'induction de la différenciation (2,5 fois) ou après au jour 4 (5,3 fois) en comparaison avec les cellules traitées uniquement avec la diosgénine ($^{\#}P<0,05$). Cette inhibition s'est accompagnée d'une accumulation de la forme LC3A/B-II de moyenne de 1,2 fois ($^{\#}P<0,05$) en comparaison avec les cellules traitées uniquement par la diosgénine validant ainsi la répression du flux d'autophagie.

D'autre part, l'activation de l'autophagie par la Met (0,25 mM) n'a eu aucun effet significatif sur l'expression de Bécline-1, Atg7, Atg12-5, Atg3 et la conversion de LC3A/B-I en LC3A/B-II indépendamment du temps de traitement (**Figure 33**). Dans l'ensemble, l'activation de l'autophagie n'a eu aucun effet sur l'expression des protéines d'autophagie, que ce soit au stade précoce ou tardif de la différenciation des mégacaryocytes.



A



B

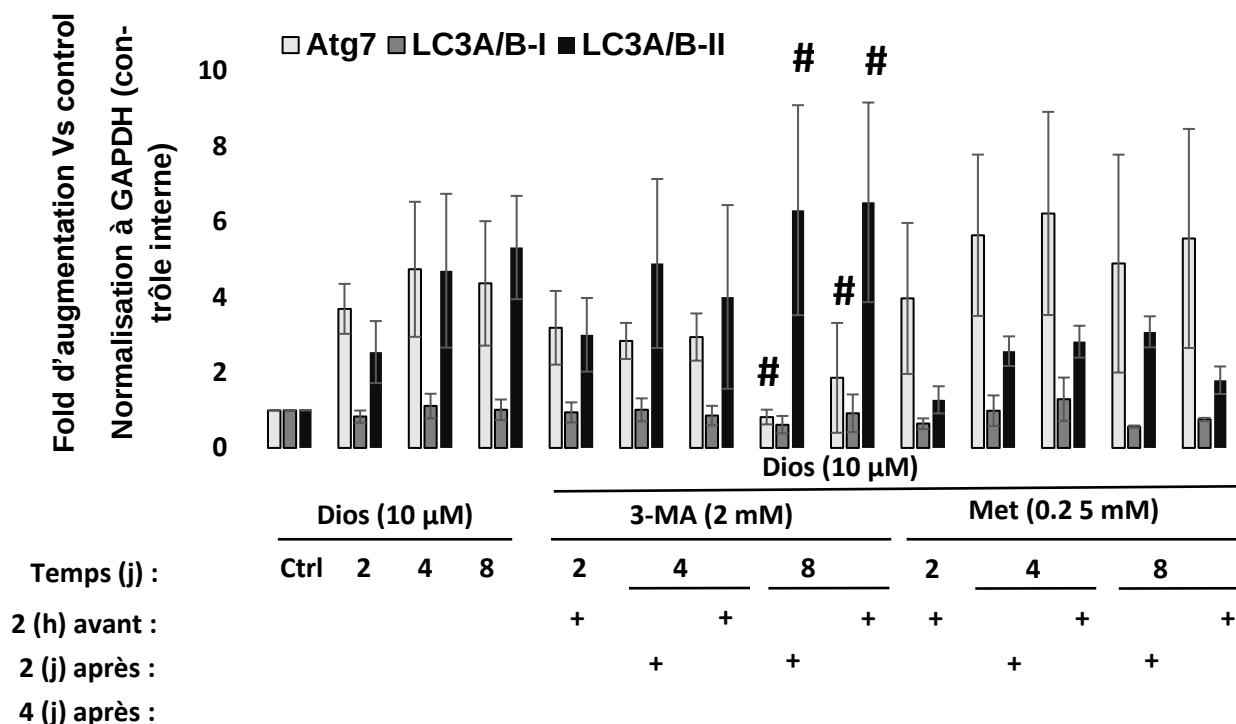


Figure 33 : L'expression des effecteurs clés de l'autophagie au cours de la différenciation mégacaryocytaire des HELs induite par la diosgénine et après la modulation de l'autophagie par 3-MA et Met.

(A) L'expression de bécline-1, Atg7, Atg12-5, Atg3 et LC3-A/B a été évalué par western blot (GAPDH a été utilisé comme un contrôle interne, les blots sont quantifiés et les valeurs sont représentatifs de trois expériences séparées). (B) l'augmentation de fold est exprimée sous forme des moyennes $\pm$ SEM (n=3). *P<0.05 vs groupe ctrl. Dios : diosgénine ; Ctrl, contrôle. ; LC3A/B : light chain 3 A/B.

Tableau 4 : les folds d'expression en comparaison avec les cellules traitées uniquement par 10 µM de diosgénine (n=3 ; #P<0.05).

	Jour 8	
Protéines	3-MA 2h en amont	3-MA jour 4 en aval
Atg7	x 2,5	x 5,3
LC3A/B-II	x 1,22	x 1,18

Les résultats montrent que l'inhibition de l'autophagie par la 3-méthyladénine inhibe l'expression d'Atg7 et induit l'accumulation de LC3A/B-II au stade tardif de la différenciation. Tandis que l'activation par la metformine, n'induit aucun effet sur l'expression de ces protéines.



III. Effet de la modulation de l'autophagie sur la polyploïdisation caractéristique de la différenciation mégacaryocytaire (maturation nucléaire).

La différenciation mégacaryocytaire est caractérisée par une maturation nucléaire conduisant à une polyploïdisation (contenu en ADN du noyau >4N chromosomes). La polyploïdie est considérée comme un marqueur majeur de la différenciation mégacaryocytaire en augmentant la teneur en ADN jusqu'à 128N. En 2006, la polyploïdie a été utilisée par Leger et al. pour évaluer la différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL après traitement par 10 μ M de diosgénine. Le contenu en ADN dans les cellules différenciées atteint 64N à la fin de la différenciation (jour 8) (13,415).

Pour analyser l'effet de la modulation de l'autophagie sur la différenciation mégacaryocytaire induite par la diosgénine, nous avons évalué la polyploïdisation dans les cellules différenciées après modulation de l'autophagie par 3-MA ou Met. Les résultats sont présentés sous forme de pourcentages de cellules qui ont un contenu en ADN 2N, 4N, 8N, 16N, 32N et 64N. Pour simplifier l'analyse, les cellules ont été catégorisées en deux groupes, les cellules non différenciées (2N et 4N) et cellules polyploïdes (>4N) en cours de différenciation mégacaryocytaire.

Les résultats de la **Figure 34** corroborent tout d'abord les données obtenues précédemment dans le laboratoire avec une polyploïdisation progressive des cellules traitées par la diosgénine seule. La population des cellules témoins est constituée de 90% de cellules présentant un contenu en ADN 2N et 4N et d'un faible pourcentage de cellules polyploïdes (9%). Le pourcentage de cellules polyploïdes passe ainsi à 36% au jour 2 et à 46% aux jours 4 et 8 avec une augmentation, là aussi progressive, des cellules vers les plus hauts niveaux de ploïdie (64N).

Nous avons ensuite évalué l'effet de la modulation de l'autophagie sur la maturation nucléaire.

Nos résultats montrent que l'inhibition de l'autophagie par la 3-MA a réduit la polyploïdisation aux stades tardifs (jours 4 et 8) de la différenciation mais pas à un stade précoce (jour 2) (**Figure 34**). Ainsi, aux jours 4 et 8, nous avons observé une forte inhibition de la polyploïdisation si les cellules HELs étaient pré-traitées 2h par la 3-MA avant induction de la différenciation (respectivement 48% et 50% d'inhibition vs les cellules traitées uniquement par diosgénine aux jours 4 et 8, $^{#}P<0,05$). Une inhibition de l'autophagie après induction de la différenciation (jour 2 ou jour 4) réduit également la polyploïdisation mais avec des taux d'inhibition significativement moins éle-



vés par rapport à une inhibition en amont (35% et 26% d'inhibition respectivement vs les cellules traitées uniquement par la diosgénine au jour 4 et 8, $^{#}P<0,05$) (**Figure 34**).

Au contraire, indépendamment du temps de traitement, l'activation de l'autophagie par la Met n'a eu aucun impact sur la polyploïdisation (**Figure 34**) quel que soit le moment où le traitement a été effectué par rapport à l'induction de la différenciation.

Globalement, ces résultats ont démontré un fort effet de l'inhibition de l'autophagie qui réduit nettement la polyploïdisation dans les stades tardifs de la différenciation. À l'inverse une activation de l'autophagie semble sans effet sur la polyploïdisation.

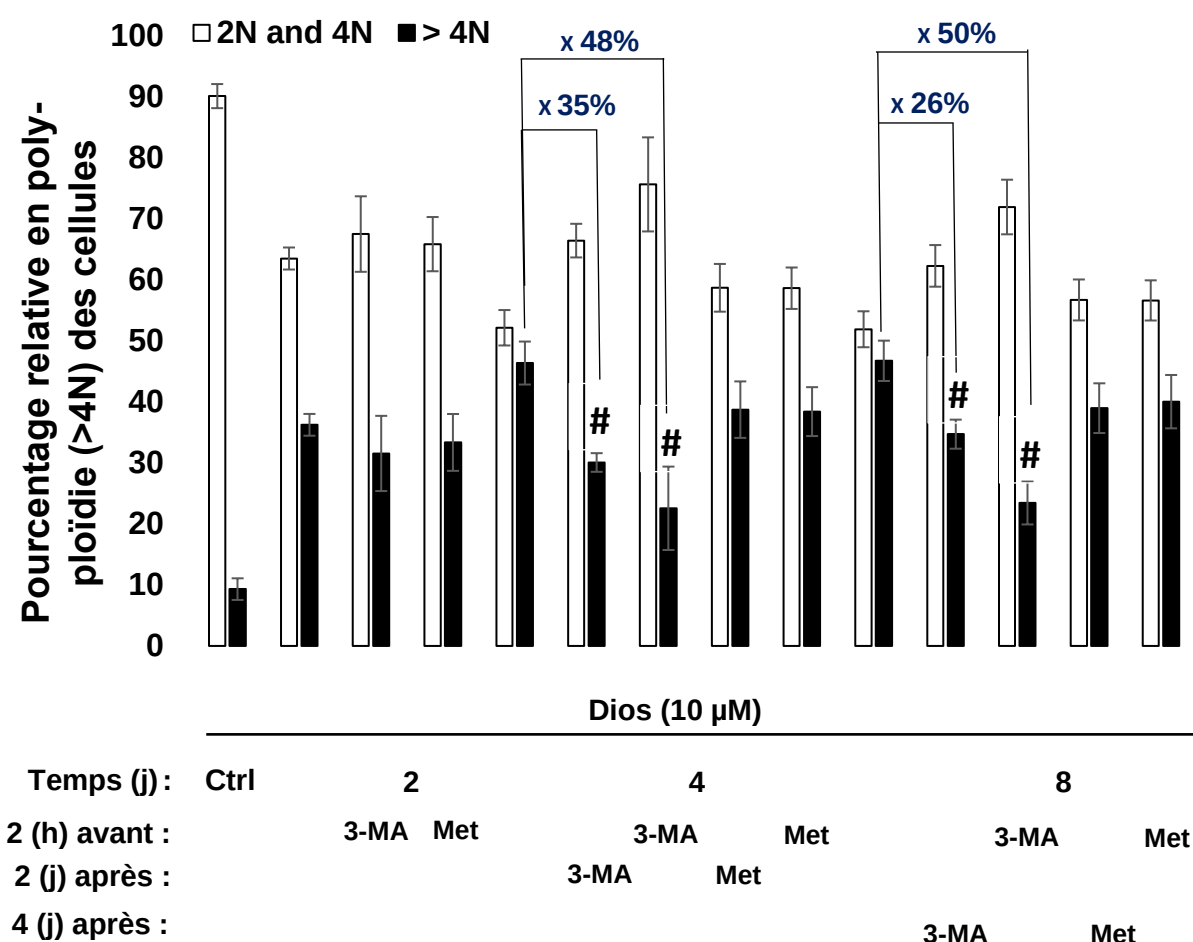


Figure 34 : l'effet de la modulation de l'autophagie par 3-MA ou Met sur la différenciation mégacaryocytaire des HELs induite par 10 μ M de diosgénine.

Le pourcentage relatif de la polyploïdie est détecté par la cytométrie en flux. Les valeurs sont représentées sous forme des moyennes $\pm$ SEM (n=3). $^{#}P<0,05$ vs les cellules traitées uniquement par la diosgénine (>4N). Dios : diosgénine, Ctrl : contrôle ; 3-MA : 3-méthyladénine, Met : metformine.



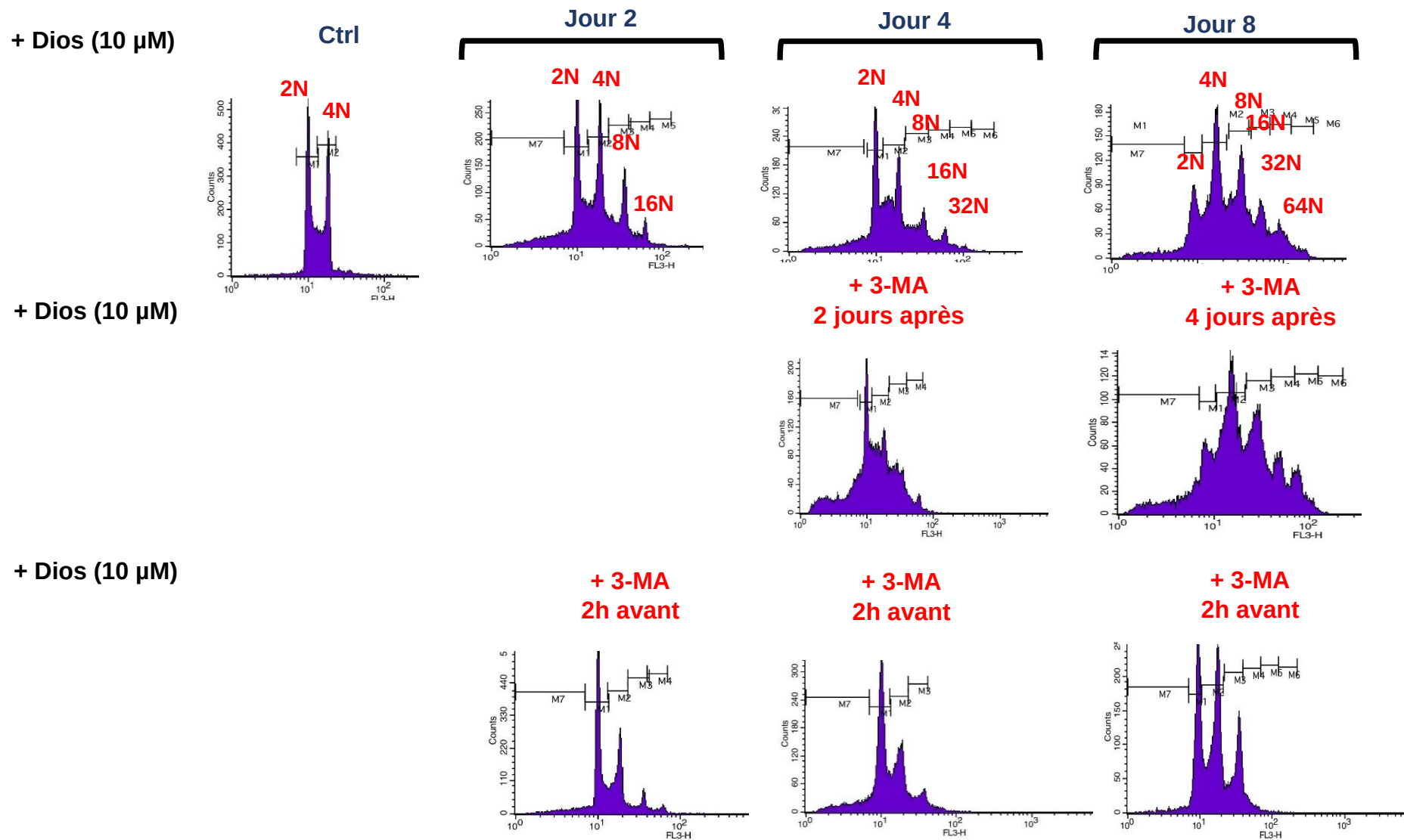


Figure 35 : l'effet de l'inhibition de l'autophagie sur la différenciation mégacaryocytaire des HELs induite par la diosgénine. Les cyto-grammes représentent la polyploidie. L'analyse du contenu en ADN est effectuée suite au marquage de cellules par l'iodure de propidium.



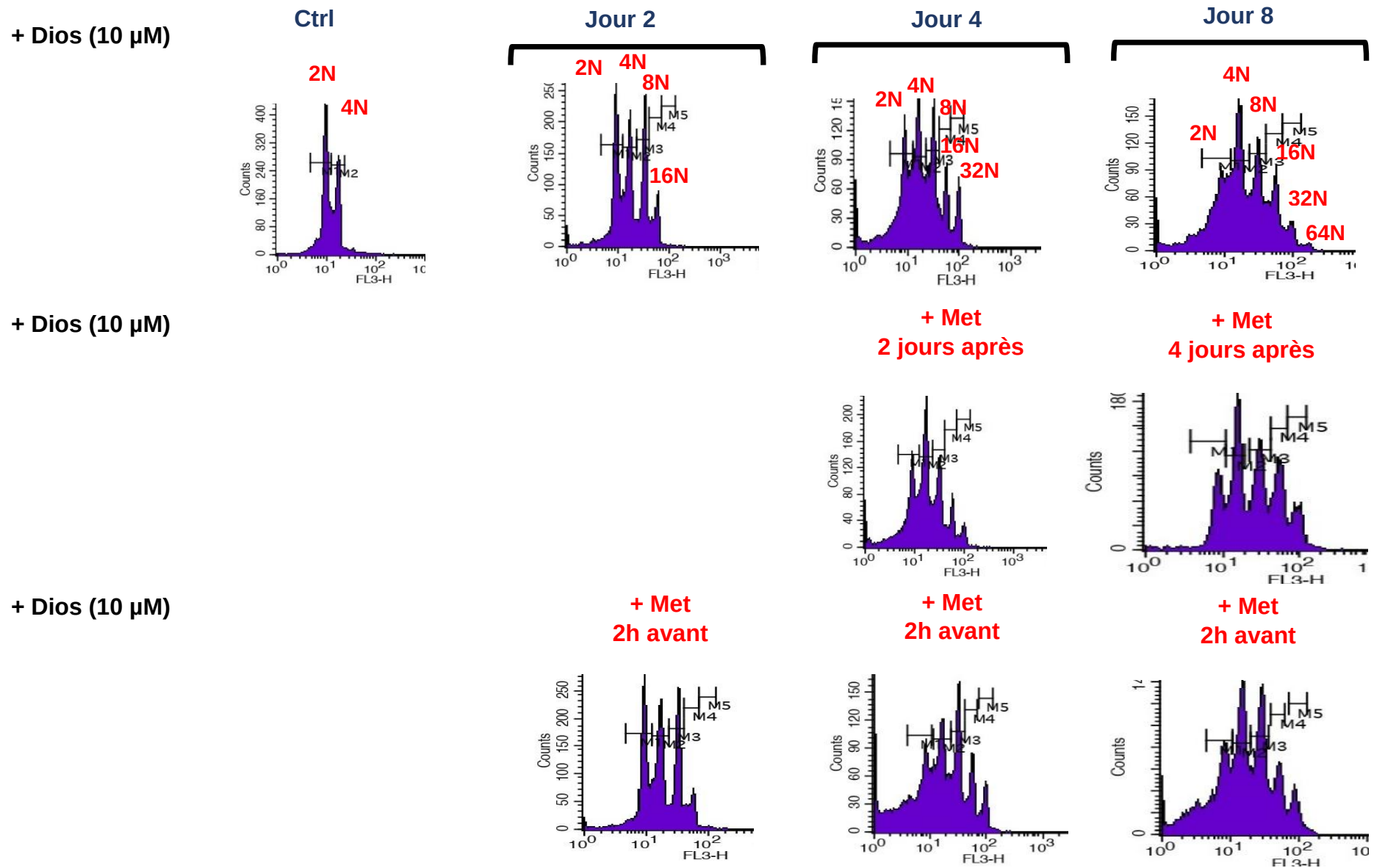


Figure 36 : l'effet de l'activation de l'autophagie sur la différenciation mégacaryocytaire des HELs induite par la diosgénine. Les cytogrammes représentent la polyploïdie. L'analyse du contenu en ADN est effectuée suite au marquage de cellules par l'iodure de propidium.



Ces résultats montrent que la modulation de l'autophagie au temps précoces de la différenciation n'affecte pas la polyploïdie. Dans les temps tardifs, 3-MA inhibe la polyploïdie tandis que metformine ne donne aucun effet.

IV. Effet de la modulation de l'autophagie sur l'expression génomique de GpV (glycoprotéine V, maturation membranaire)

L'expression génomique et membranaire de la Glycoprotéine V (GpV) est un marqueur tardif de la différenciation mégacaryocytaire. En 2006, Leger et al., ont montré une augmentation de l'expression de GpV au cours de la différenciation des cellules HELs induite par la diosgénine (415).

Dans notre étude, nous avons mis en évidence une augmentation progressive de l'expression de l'ARNm de la GpV (**Figure 37**). Cette augmentation est nette à partir du jour 4 et très marquée en fin de la différenciation.

Concernant la modulation de l'autophagie, nous avons montré que ni l'activation ni l'inhibition de l'autophagie n'induit d'effet sur l'expression génomique de GpV aux temps précoces de la différenciation (jour 2).

Ensuite, comme le montre la Figure 37-A, la 3-MA induit une diminution forte de la transcription de la GpV au cours de la différenciation mégacaryocytaire induite par la diosgénine. Après 4 jours de différenciation, cette diminution se produit quel que soit le moment de traitement par la 3-MA (diminution de 9 fois pour un traitement en amont (2 h avant) et de 2 fois pour un traitement en aval (2 jours après), $^{\#}P < 0,05$; **Figure 37-A**). En fin de différenciation, 8 jours après induction par la diosgénine, cette diminution était encore plus drastique (>13 fois, $^{\#}P < 0,05$; **Figure 37-A**). Ce trait était similaire à la diminution observée dans le processus de polyploïdisation après traitement par la 3-MA (Figure 35).

Concernant l'effet de l'induction de l'autophagie, nous avons observé que la Met induit une augmentation de la transcription du GpV au cours de la différenciation mégacaryocytaire induite par la diosgénine. Cette augmentation a commencé après 4 jours de différenciation induite par la diosgénine et a duré jusqu'à la fin du traitement (jour 8) quel que soit le temps de traitement auquel la Met a été ajoutée (1,7 et 1,6 fois $^{\#}P < 0,05$; **Figure 37-B**).



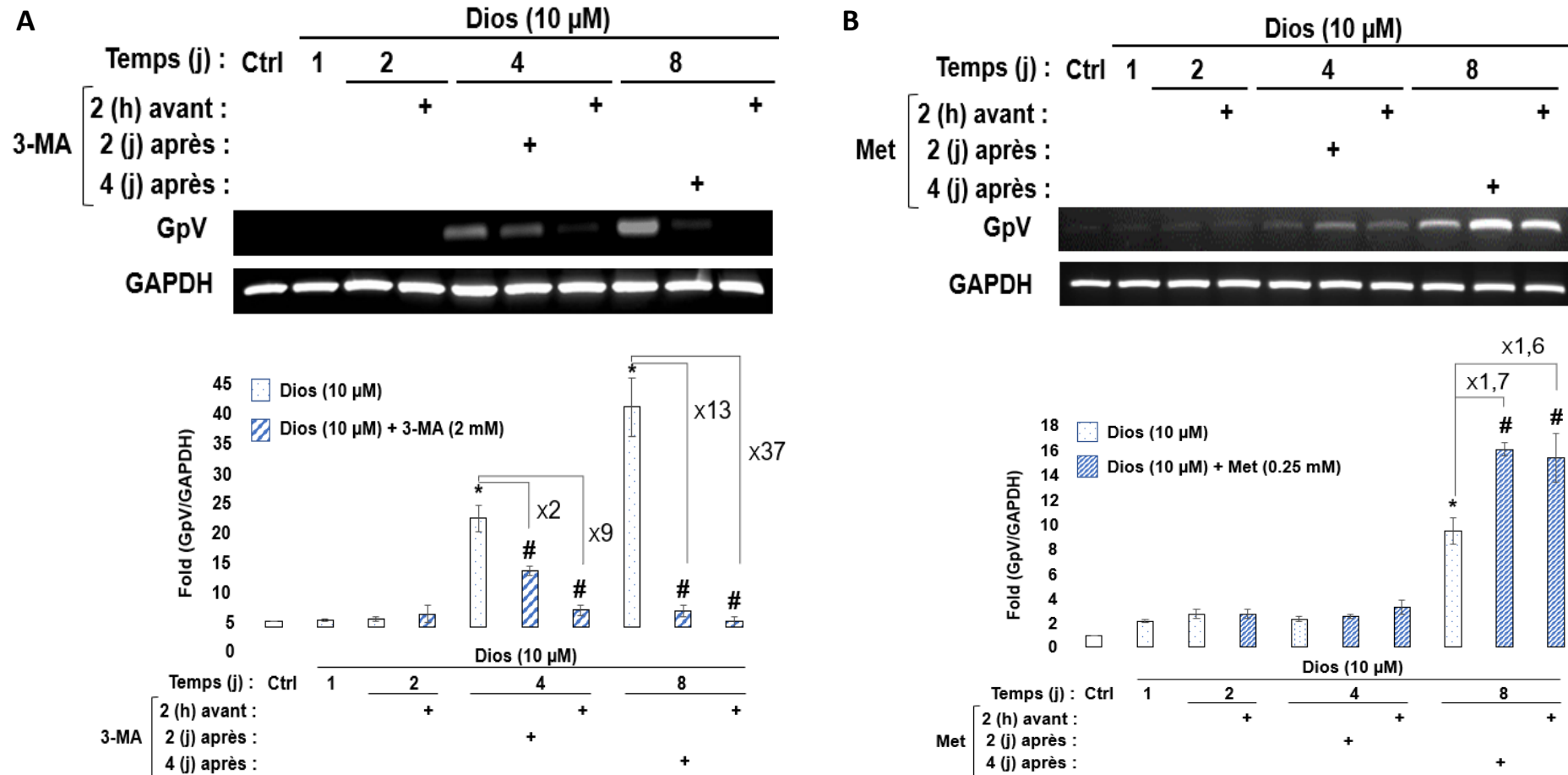


Figure 37 : l'effet de la modulation de l'autophagie sur l'expression génomique de GpV durant la différenciation mégacaryocytaire des HELs induite par 10 μ M de diosgénine

Transcription inverse de l'ARNm de GpV extrait des cellules et amplification de l'ADNc par PCR. L'analyse semi quantitatif est effectué suite à la migration de l'ADN obtenu sur un gel d'agarose et sa normalisation à l'expression de GAPDH (A) 3-MA (B) Met. Les valeurs sont représentées sous forme des moyennes $\pm$ SEM de cinq expériences séparées. *P<0.05 vs contrôle et #p<0.05 vs cellules traitées avec la diosgénine.

Dios : diosgénine ; Ctrl : contrôle ; 3-MA : 3-méthyl adénine ; Met : metformine.



Ces résultats montrent que le 3-MA inhibe fortement l'expression génomique de GpV aux jours 4 et 8 de la différenciation. Par contre, metformine induit l'expression de GpV durant la phase terminale de la différenciation.

V. Effet de modulation de l'autophagie sur le taux de la fragmentation d'ADN au cours de la différenciation mégacaryocytaire.

En 2002, De Botton et al. ont rapporté qu'au cours du stade précoce de la différenciation mégacaryocytaire, l'activité de la caspase-3 était détectée de manière localisée dans le cytoplasme mais n'était liée à aucun signal de fragmentation de l'ADN. En 2006, selon Leger et al. au jour 2 de la différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL traitées par la diosgénine, il y a un pic d'activité de caspase 3. Après ce jour, le niveau d'activité de caspase-3 revient à un taux basal puis augmente progressivement jusqu'à la fin de la différenciation.

Ici, nous avons étudié l'effet de la modulation de l'autophagie au cours de la différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL induite par la diosgénine sur la fragmentation de l'ADN. Comme le montre la **Figure 38**, la fragmentation de l'ADN augmente significativement à partir du jour 2 de la différenciation par rapport aux cellules témoins (4,9 fois vs témoins, $*P < 0,05$) et continue d'augmenter jusqu'à la fin de la différenciation (6,9 et 11,2 fois aux jours 4 et 8 respectivement vs cellules témoins). Comme les **Figures 38-A et 38-B** rapportent, la modulation de l'autophagie 2 h avant ou au jour 2 ou 4 après le traitement des cellules HEL avec la diosgénine n'a pas modifié de manière significative le processus de fragmentation de l'ADN.



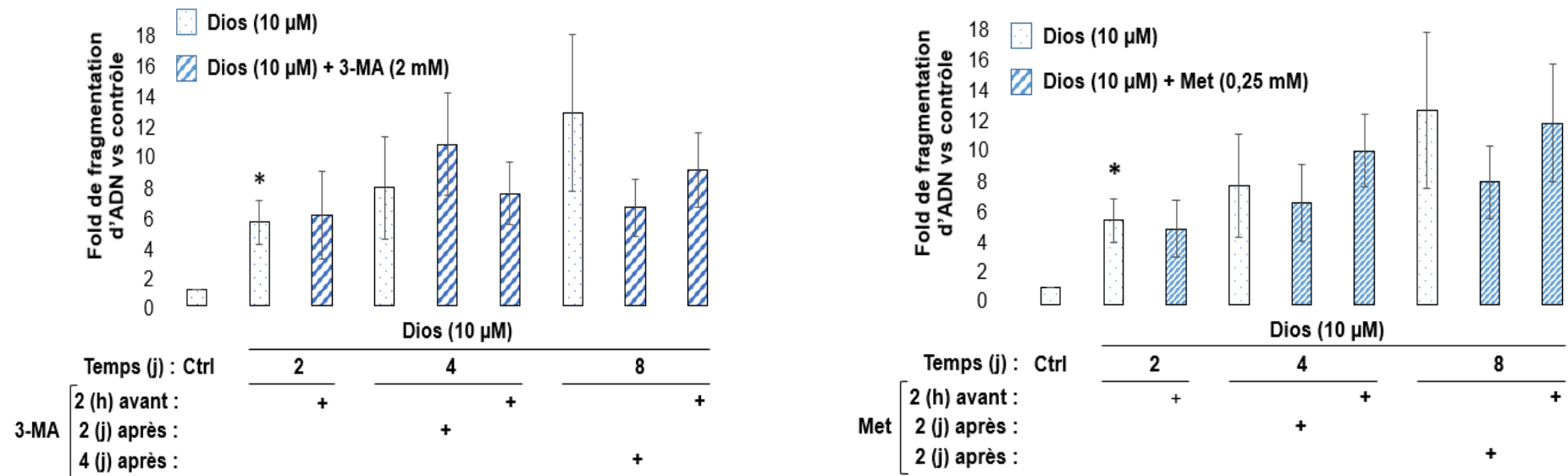


Figure 38-A-B : Effet de modulation de l'autophagie durant la différenciation mégacaryocytaire sur le taux de fragmentation d'ADN

Les folds de fragmentation d'ADN sont étudiés en utilisant le kit ELISA. Suite à la modulation de l'autophagie par le 3-MA (A) et la metformine (B), les cellules sont récupérées aux jours 2, 4 et 8 de la différenciation. Les folds sont obtenues après normalisation par rapport au contrôle. Les Folds représentent les moyennes $\pm$ SEM de trois expériences séparées (n=3). Les valeurs *P<0.05 sont obtenues en comparant avec le contrôle.



Discussion

La thérapie conventionnelle est caractérisée toujours par ses effets indésirables sur les patients. Comme alternative dans les dernières décennies la thérapie de différenciation vient pour prendre une importance dans l'approche thérapeutique des sujets leucémiques. Nombreuses sont les molécules naturelles étudiées par les chercheurs mais la plus connue est l'acide rétinoïque (AR) (34). C'est un dérivé de vitamine A utilisé cliniquement dans le traitement des leucémies aiguës promyélocyaires (APL).

Diosgénine est un stéroïde végétal marqué par ces divers effets pharmaceutiques (397). Dans notre laboratoire, des publications par Leger et al. ont montré l'effet différenciant de diosgénine sur les HELs. Leurs résultats illustrent concrètement les différents aspects moléculaires impliquées lors de la différenciation mégacaryocytaire (13,401,415). Selon Leger et al. en 2006, les voies p-Akt, Bcl-2, p-ERK1/2, caspase-3 sont potentiellement modulées durant la maturation des HELs traitées par 10 μ M de diosgénine (13). En outre, Ils ont montré ainsi que des autres équipes que l'apoptose est essentielle pour la fragmentation des mégacaryocytes matures pour garantir la libération des plaquettes ou des pseudo-plaquettes dans le milieu extracellulaire (297,298,418). Dans notre étude, nous avons été intéressé par l'implication de l'autophagie durant ce processus. Partant de la littérature, durant la différenciation mégacaryocytaire des nombreuses voies de signalisation occurrentes sont commune avec le processus de l'autophagie (345,416,418). L'autophagie est une voie d'homeostasie cellulaire impliquée dans le recyclage des macromolécules et l'adaptation des cellules à toute forme de stress (345). Selon plusieurs études la macroautophagie, microautophagie et l'autophagie médiée par les chaperonnes sont connus par leurs rôles dans le fonctionnement, l'homeostasie et la maintenance de la capacité d'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques (CSH) (366,378,419,420). Depuis 1970, de nombreuses pathologies liées aux mégacaryocytes comme l'ITP (immune thrombocytopenia) décrivent l'apparition de vacuoles d'autophagie dans ces cellules (212). Ultérieurement, des travaux sont amenés pour éclaircir le rôle de l'autophagie durant la différenciation mégacaryocytaire. En 2009, Colosetti et al., démontraient que le flux d'autophagie est induit suite à la différenciation des K562, cellules de leucémie myéloïde chronique par le PMA. Ils ont montré que le nombre des vacuoles autophagique



augmentent dans les cellules post-traitées dès 16h de différenciation. Leurs résultats montraient que le knock down de bécline-1 et LC3 dans les cellules a inhibé fortement la différenciation mégacaryocytaire (416). Plus tard, en 2015, Cao et al. ont montré que le Knock-out d'Atg7, un analogue de l'enzyme E1 activatrice dans le système d'ubiquitination, induit une abrogation de la différenciation mégacaryocytaire en diminuant le nombre des mégacaryocytes dans la moelle osseuse (380). Dans notre étude, nous sommes intéressés par l'implication de la macroautophagie durant la différenciation mégacaryocytaire des HELs induite par 10 μ M de diosgénine. On a commencé par la détection de l'expression protéique des effecteurs clés de l'autophagie. On a montré que Atg7 était uniquement stimulé suite à l'induction de la différenciation accompagné d'une accumulation progressive de LC3A/B-II. Bécline-1 et les autres enzymes analogues au système d'ubiquitination n'ont été pas affecté et cela pourrait être expliqué par la stimulation d'une voie autophagique non canonique laquelle n'incluent pas forcément tous les effecteurs clés de l'autophagie. Atg7 joue divers rôles physiologiques pas toujours liés au processus autophagique de façon que sa modulation induit des infections, de cancer, de neurodégénérescence et de l'inflammation (382,421). Pour mieux identifier l'implication de l'autophagie dans notre modèle, on a décidé de la moduler en utilisant 3-MA et metformine. On a modulé l'autophagie avant et après l'induction de la différenciation mégacaryocytaire. On voulait savoir l'effet de l'autophagie sur la différenciation mégacaryocytaire des HELs à court et long terme. 3-MA est un inhibiteur de PI3K-complexe III et plus précisément la sous-unité VPS34 (422). Nos résultats ont montré que 3-MA inhibe l'expression d'Atg7 avec une significative accumulation de LC3A/B-II à la fin de la différenciation et pas avant. Par contre on n'a pas vu aucun effet sur l'expression de bécline-1 ni les autres Atgs. En 2010, Wu et al. ont publié un article qui montre que 3-MA n'est pas un inhibiteur spécifique pour PI3K-complexe III mais selective pour la famille de PI3K (422). En 2006, Leger et al. ont montré que p-Akt est activé au stade précoce de la différenciation mégacaryocytaire (418). Dans la même année Raslova et al. ont montré que l'inhibition de mTORC1 réduit fortement la maturation nucléaire ainsi que membranaire des mégacaryocytes (423). D'un autre côté, la voie de mTOR inhibe l'autophagie suite à une série de phosphorylation du complexe PI3K-complexe III (344).

Dans un second lieu, On a activé l'autophagie par metformine et on n'a pas détecté aucune conséquence sur les effecteurs clés de l'autophagie indépendamment du temps de traitement soit avant ou après l'induction de la différenciation. Metformine



active l'autophagie par le biais de l'axe AMPK (365). Normalement, la metformine est utilisée pour le traitement de diabète type II et n'a jamais été utilisée dans le traitement des leucémies. Dans la littérature on ne trouve aucune information illustrant l'activité d'AMPK durant la différenciation mégacaryocytaire.

L'effet de 3-MA et metformine (met) sur la différenciation mégacaryocytaire induite par la diosgénine (10 μ M) :

➤ ***La maturation nucléaire : La polyploïdie***

En 2006, Leger et al. ont rapporté que la teneur en ADN a atteint 64N à la fin de la différenciation des HELs par la diosgénine (398,405). Pour mieux déterminer l'implication de l'autophagie durant la différenciation mégacaryocytaire, on a examiné l'effet de la modulation de ce processus sur la maturation nucléaire. Nos résultats ont montré que la polyploïdie n'a pas été affecté par l'effet modulateur de l'autophagie au jour 2. Cette insensibilité montre que les cellules à ce stade sont résistantes à l'autophagie. Cependant, nos constatations continuent de faire l'objet d'investigations vu qu'il a été démontré par Leger et al. que les voies Bcl-2 et p-Akt inhibitrices de l'autophagie sont activées (418). Aux stades plus avancés, nos résultats ont montré que l'inhibition de l'autophagie réduisait la maturation nucléaire. On a noté que la réduction était plus intense si les HELs sont pré-traitées par le 3-MA. Nos résultats sont compatibles avec les observations de Wang et al. en 2017. Ils ont montré que l'inhibition de l'autophagie par la bafilomycine A1 (inhibiteur de la dégradation autophagique) réduisait le pourcentage de la population polyploïde ($\geq 8N$) des cellules de foie fœtal différenciées par TPO (thrombopoïétine). Dans la même étude ils ont montré que l'inhibition de l'autophagie dans les mégacaryocytes matures n'induisait aucun impact sur la maturation ou la plaquetogénèse (381). Une autre étude conduite par Cao et al. en 2015 a montré que la délétion d'Atg7 dans les cellules hématopoïétiques chez les souris inhibait fortement la polyploidie (380).

En deuxième lieu, l'activation de l'autophagie par la metformine n'a pas modulé significativement la teneur en ADN suite au traitement des HELs par la diosgénine. Dans la littérature l'activateur d'autophagie le plus utilisé est la rapamycine. En 2006, Drayer et al. ont signalé l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine dans les cellules MO7e et les progéniteurs primaires mégacaryocytaires humains n'affecte pas la polyploïdie après l'induction de la différenciation par la thrombopoïétine (TPO) (424). Ce n'est pas toujours le cas, en 2017, Wang et al. ont confirmé que l'activation de l'autophagie par



la rapamycine inhibe la polyploidie dans les cellules de foie fœtal différenciées par TPO (381). Paradoxalement, Un autre travail publié en 2020 par Sun et al. rapporte que l'activation de l'autophagie par la rapamycine dans les cellules Dami (lignée mégacaryoblastique) différenciées par le TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate) augmente significativement la polyploïdie de manière dose-dépendante (425).

➤ **La maturation membranaire : l'expression génomique de GpV :**

La maturation membranaire des mégacaryocytes est définie par l'apparition et l'augmentation de l'expression des récepteurs membranaires caractéristiques des mégacaryocytes matures. Selon Leger et al., suite au traitement des HELs par 10 μ M de diosgénine, les cellules commencent à exprimer les marqueurs de surface spécifiques dès le jour 1 de la différenciation. Selon leurs résultats, l'expression génomique de CD41⁺, CD61⁺, CD62⁺, GpIX et GpV augmente jusqu'à la fin de différenciation (jour 8) (403). Étant donné que l'expression de GpV était la plus prononcée, on a décidé de la détecter pour évaluer l'effet de la modulation de l'autophagie sur la maturation membranaire. Dans la littérature, les chercheurs détectent le plus souvent CD41⁺ et CD61⁺ comme marqueurs membranaires. Selon Colosetti et al. en 2009, l'inhibition de l'autophagie par la 3-MA inhibait fortement l'expression membranaire de CD41⁺ durant la différenciation mégacaryocytaire des K562 (lignées de LMC) induite par le PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate). En outre, ils ont validé ces observations suite à un knock-down de bécline-1 et de LC3 (416). Une autre étude menée par Cao et al. en 2015 a montré que la délétion d'Atg7 dans les cellules hématopoïétiques inhibait l'expression membranaire de CD41⁺. Ce profil était synchronisé avec celui de la maturation nucléaire (380). Ultérieurement, en 2017, Liu et al. ont rapporté que les cellules K562 différenciées par la tetrandrine (un alcaloïde) et prétraitées par la 3-MA ont subi une inhibition de l'expression membranaire de CD41⁺ (426). D'autres chercheurs ont montré que l'utilisation d'un autre inhibiteur de l'autophagie, bafilomycine A1, n'a pas influencé l'expression de CD41⁺ sur la surface des cellules de foie fœtal différenciées par le TPO contrairement à la polyploïdie inhibée (381). Nos travaux montrent une compatibilité avec la littérature. L'inhibition de l'autophagie reprimait l'expression génomique de GpV à partir de jour 4 de la différenciation et que cette répression était plus intense si les cellules sont prétraitées par la 3-MA. Pourtant, l'activation de l'autophagie n'a généré aucune modification dans l'expression génomique de GpV avant le jour 8 de la différenciation. Cette augmentation pourrait être corrélée à la faite que les



plaquettes sont des cellules anucléées et leurs récepteurs sont ceux qui sont fabriqués par les mégacaryocytes (91,172).

Cet effet est contradictoire avec la littérature et dépend du type de la lignée cellulaire. Dans les cellules de foie fœtal, l'activation de l'autophagie par rapamycine induisait une inhibition de l'expression membranaire de CD41⁺ (381). Par contre dans les cellules Dami (lignée mégacaryoblastique), rapamycine activait l'expression de CD41⁺. Souvent les maturations membranaire et nucléaire sont synchronisées (425) mais ce n'est pas toujours le cas. En 2011, Liu et al. ont montré que les MKs néonatales (micro MKs) pouvait atteindre une maturation complète et un profil de récepteurs membranaires mature avec un faible niveau de polyploïdie (4N) (427).

La fragmentation d'ADN suite à la modulation de l'autophagie durant la différenciation mégacaryocytaire induite par la diosgénine 10 μ M :

La fragmentation de l'ADN est le produit de l'activation catalytique de caspase-3 et souvent une conséquence de l'activation de l'apoptose dans les cellules (292). Selon Leger et al., dans les cellules HELs différenciées par 10 μ M de diosgénine l'activité de caspase-3 s'élevait au jour 2 avant de reprendre un niveau basal au jour 4 (418). Selon eux, ce profil est indépendant de l'apoptose mais lié plutôt à l'amorcement de la plaquetogenèse à ce stade. Néanmoins, les cellules après le jour 4 entraient dans la phase apoptotique pour que les mégacaryocytes se fragmentaient et libéraient les pseudo-plaquettes dans le milieu extracellulaire (418). En 2002, De Botton et al. ont rapporté une activité précoce de caspase-3 localisée dans le cytosol et indépendante de l'apoptose car elle ne conduisait pas à la fragmentation de l'ADN. En revanche, dans les stades tardifs de la différenciation, la fragmentation de l'ADN augmentait suite à une activité de caspase-3 diffusé à l'intérieur des cellules (304). Théoriquement la fragmentation d'ADN se fait par le CAD (Caspase-Activated DNase) entre deux nucléosomes (280). Falcieri et al. ont démontré que les mégacaryocytes des stades tardifs de différenciation ne présentaient aucun signal de fragmentation de l'ADN. En utilisant l'analyse par électrophorèse, ils ont suggéré que la fragmentation de l'ADN n'était pas internucléosomale comme la majorité des lignées de cellules hématopoïétiques qui subissent l'apoptose et les fragments d'ADN n'apparaissaient donc pas sur le gel d'agarose (428).

L'ITP est une maladie caractérisée par la baisse de nombre des plaquettes. En 2018, un test TUNEL réalisé sur des coupes histologiques appartenant à des patients



atteignent de thrombocytopénie immunitaire (ITP) a démontré l'absence de signaux de fragmentation de l'ADN dans les mégacaryocytes complètement matures (429). Ce qui montre que l'apoptose est strictement liée à la formation et libération des plaquettes dans la circulation sanguine. Ici, dans notre étude, le test de fragmentation de l'ADN n'a montré aucune variation statistiquement significative de la fragmentation de l'ADN suite à la modulation de l'autophagie dans les cellules différenciées.



Conclusion et perspective

Deux stratégies utilisées pour le traitement de cancer : en induisant la mort cellulaire programmée, l'apoptose, ou en réamorçant le processus de la différenciation bloquée lors de la transformation cancéreuse. La thérapie de différenciation est utilisée pour le traitement des leucémies par des substances naturelles ou chimiques (409). Dans notre laboratoire depuis des vingtaines d'années, Beneytout et al. ont publié l'effet différenciant de la diosgénine, un stéroïde végétal, sur les cellules érythroleucémiques humaines (HELs) (404).

Parmi les voies de mort cellulaire impliquées dans la différenciation mégacaryocytaire, on cite l'apoptose. Des autres études mettent en relief l'implication de l'autophagie durant ce processus (380,381,416). L'autophagie est une voie d'homéostasie cellulaire permet aux cellules de s'adapter à toute forme de stress. À côté de son rôle dans la cytoprotection des cellules, l'autophagie a des fonctions cruciales dans les cancers, le développement et la différenciation cellulaire (430).

Ce projet de recherche s'inscrivant dans la continuité d'un travail de recherche réalisé en 2006 par David Leger. Il a montré que l'apoptose est impliquée dans la différenciation mégacaryocytaire des HELs induite par 10 μ M de diosgénine (418). L'objectif de notre travail est d'étudier l'implication de l'autophagie dans la différenciation mégacaryocytaire des HELs induite par diosgénine.

En premier temps, on a montré que le flux autophagique est stimulé pendant les 8 jours de la différenciation mégacaryocytaire. Cette stimulation est traduite par la surexpression de l'Atg7 après le jour 1 de la différenciation. On a observé également une accumulation de la forme LC3A/B-II après le jour 2 de la différenciation comme preuve de stimulation de la voie autophagique. Pour plus examiner l'implication de l'autophagie dans la différenciation, on l'a modulé par deux molécules qui affectent l'initiation de cette voie. Les résultats montrent que le 3-MA (2 mM) induit une inhibition de la voie autophagique (répression de l'atg7 et l'accumulation de LC3A/B-II) à la fin de la différenciation et pas avant. Tandis que la metformine (0.25 mM) n'induit aucun effet statistiquement significatif. En outre, on a montré que la modulation de l'autophagie avant le réamorçage de la différenciation n'a aucun effet sur la maturation nucléaire ou la maturation membranaire au jour 2 de ce processus. Ce qui montre que



les cellules en temps précoce de la différenciation sont insensibles à l'autophagie. Dans les temps plus tardifs, on a montré que l'inhibition de l'autophagie par la 3-méthyladénine réprime la polyploïdie et l'expression génomique de GpV. En revanche, il n'y a aucun effet de l'activation de l'autophagie sur la polyploïdie malgré que la metformine induit une augmentation de l'expression génomique de GpV au jour 8 de la différenciation.

Pour mieux comprendre la relation entre la maturation nucléaire et membranaire, autres types de marqueurs membranaires devraient être analysés (CD41⁺ et CD61⁺) pour éviter tout doute concernant la synchronisation de ces deux types de maturation. En outre, d'autres types de modulateurs d'autophagie devraient être utilisés comme le Baf A1 (bafilomycine A1, inhibiteur de la fusion des lysosomes avec l'autophagosome) ou Z36 (inhibiteur de Bcl-2) pour décélérer plus précisément le rôle de l'autophagie dans la différenciation mégacaryocytaire. Vu que Atg7 et LC3 sont les protéines clés de l'autophagie modulées suite au traitement des HELs par la diosgénine, leur knock-down aura un impact plus ciblé sur le rôle de l'autophagie durant la différenciation des HELs.

Selon Leger et al. en 2006, il y a un pic soudain de caspase-3 au jour 2 de la différenciation qui peut être en relation avec le début de la plaquetogénèse (13). Ils ont confirmé également l'activation de l'expression de PARP, le substrat de caspase-3, dès le jour 2 de la différenciation. Selon nos résultats, le traitement des cellules par la diosgénine a induit une augmentation de fragmentation d'ADN à partir du jour 2 de la différenciation et a resté statistiquement stable jusqu'à la fin de la différenciation. En plus, on a montré que la modulation de l'autophagie n'induit aucune fluctuation du taux de fragmentation d'ADN. Ces résultats pourraient être expliqués par l'absence de la relation directe entre l'autophagie et l'apoptose durant la différenciation mégacaryocytaire induite par la diosgénine.

Des études supplémentaires concernant l'interaction de l'apoptose avec l'autophagie devraient être réalisées. Les voies de signalisation PI3K/p-AKT/mTOR, Bcl-2, NF- κ B, ERK1/2, PARP et l'activité de caspase-3 sont des effecteurs clés de la différenciation (304,418) et pourraient être étudiées plus précisément après la modulation de l'autophagie durant la différenciation mégacaryocytaire des HELs par la diosgénine.



Les études *in vivo* pourraient être envisagées. Nos travaux n'ont pas été faites sur les souris. En effet, le problème d'origine est la faible biodisponibilité de diosgénine après administration par voies orale ou intraveineuse. Une étude conduite par Liu et al. en 2016, montrent que l'administration de la diosgénine par gavage sous forme de nanocristaux assure une haute solubilité et biodisponibilité de cette molécule en comparant avec l'administration de la diosgénine sous forme brute (431). Donc un modèle d'étude *in vivo*, peut être planifié en administrant la diosgénine et/ou la 3-MA ou la metformine. Pour tester l'efficacité de ce modèle. Il faut étudier la biodisponibilité de la diosgénine dans la moelle osseuse. Par la suite il faut dénombrer le nombre des mégacaryocytes matures (coupes histologiques de MO) et le nombre des plaquettes dans la circulation sanguine. Une autre combinaison pourrait être envisagéeARN en utilisant les cristaux liquides de GMO (monooléate de glycéryle) et la diosgénine avec la cyclo-dextrine. Une étude conduite par Okawara et al. en 2014, a montré que cette combinaison augmente la solubilité de la diosgénine après administration par voie orale chez les rats (432). L'ensemble de ces propositions resteront sous enquêtes.



Table des illustrations

Figure 1 : transformation maligne des cellules souches hématopoïétiques et leurs progéniteurs myéloïdes-lymphoïdes en cellules cancéreuses.....	21
Figure 2 : Taux de mortalité en excès (en nombre de décès par personne-année) (a) et survie nette (b) selon le temps depuis le diagnostic pour différents âges, hommes et femmes ensemble- Leucémies Myéloïdes Aiguës (2010-2015 ; en France Métropolitaine).....	23
Figure 3 : Survie nette à 1 et 5 ans selon l'âges au diagnostic avec intervalle de confiance à 95%, hommes et femmes ensemble- Leucémies Myéloïdes Aiguës (2010-2015 ; en France Métropolitaine).	23
Figure 4 : stratégies de traitement des Leucémies Myéloïdes Aiguës (4).	27
Figure 5 : structure chimique du phorbol myristate acétate (PMA) (A), trioxyde d'arsenic (ATO) (B), acide rétinoïque (AR) (C), vitamine D3 ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) (D)....	32
Figure 6 : étapes de la différenciation des CSH en cellules mégacaryocytaires matures.....	34
Figure 7 : principe de l'endomitose, dédoublement du contenu en ADN avec la progression de la division cellulaire.	38
Figure 8 : différenciation mégacaryocytaire et évolution des marqueurs membranaires.....	39
Figure 9 : différentes étapes de la différenciation mégacaryocytaire (99)	41
Figure 10 : formation des plaquettes durant la différenciation mégacaryocytaire.	45
Figure 11 : facteurs de transcription et cytokines régulant les différents stades de la différenciation des mégacaryocyte (CSH-Mégacaryocytes).	54
Figure 12 : aspects morphologiques des cellules en apoptose par comparaison aux cellules normales.....	55
Figure 13 : structure des caspases chez l'homme et la souris.	61
Figure 14 : structure des protéines de la famille de Bcl-2 (305).....	62
Figure 15 : étapes d'activation des caspases	63
Figure 16 : voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.....	64
Figure 17 : fonctions essentielles de l'autophagie dans l'organisme.	65

Figure 18 : différents types d'autophagie (329).	67
Figure 19 : la macroautophagie, étapes de la formation des autophagosomes	72
Figure 20 : premier système de conjugaison analogue à l'ubiquitination.....	73
Figure 21 : deuxième système de conjugaison analogue à l'ubiquitination	73
Figure 22 : voies de signalisation régulant l'autophagie : les régulateurs de AMPK, ULK1 et mTORC1	78
Figure 23 : voies de signalisation régulant l'autophagie.	79
Figure 24 : régulation de l'autophagie suite à la dissociation du complexe Bécline-1/Bcl-2	80
Figure 25 : rôle important de l'autophagie dans la survie des cellules souches hématopoïétiques (CSH).	82
Figure 26 : autophagie : une voie d'homéostasie cellulaire entre la survie et la mort cellulaire	83
Figure 27 : structure et effet de la diosgénine.....	86
Figure 28 : inhibition de l'autophagie les cellules souches hématopoïétique inhibe la différenciation mégacaryocytaire. MK-PPF : proplatelet forming megacaryocytes (362).	88
Figure 29 : voies moléculaires impliquées durant la différenciation mégacaryocytaire (403).	89
Figure 30 : surexpression de mTOR inhibe l'autophagie dans les mégacaryocytes et provoque l'altération de la production et de la fonction des plaquettes (384).	89
Figure 31 : l'aspect morphologique des cellules érythroleucémiques humaines (HEL) suite au traitement par 10 µM de diosgénine pendant 8 jours en comparaison avec les cellules témoins.	102
Figure 32 : L'expression des effecteurs clés de l'autophagie au cours de la différenciation mégacaryocytaire des HELs induite par la diosgénine.	103
Figure 33 : L'expression des effecteurs clés de l'autophagie au cours de la différenciation mégacaryocytaire des HELs induite par la diosgénine et après la modulation de l'autophagie par 3-MA et Met.	107
Figure 34 : l'effet de la modulation de l'autophagie par 3-MA ou Met sur la différenciation mégacaryocytaire des HELs induite par 10 µM de diosgénine.....	109
Figure 35 : l'effet de l'inhibition de l'autophagie sur la différenciation mégacaryocytaire des HELs induite par la diosgénine. Les cytogrammes	

représentent la polyploïdie. L'analyse du contenu en ADN est effectuée suite au marquage de cellules par l'iodure de propidium. 110

Figure 36 : l'effet de l'activation de l'autophagie sur la différenciation mégacaryocytaire des HELs induite par la diosgénine. Les cytogrammes représentent la polyploïdie. L'analyse du contenu en ADN est effectuée suite au marquage de cellules par l'iodure de propidium. 111

Figure 37 : l'effet de la modulation de l'autophagie sur l'expression génomique de GpV durant la différenciation mégacaryocytaire des HELs induite par 10 μ M de diosgénine 113

Figure 38-A-B : Effet de modulation de l'autophagie durant la différenciation mégacaryocytaire sur le taux de fragmentation d'ADN..... 115



Table des tableaux

Tableau 1 : classification des Leucémies Aiguës Myéloïdes (LMA) selon des critères morphologiques et cytochimiques par le FAB (French-American-British Cooperative Group) en 1985.	24
Tableau 2 : classification des LMAs selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2016 (3).	25
Tableau 3 : les folds d'expression en comparaison avec les cellules témoins traitées uniquement par l'éthanol (< 0.1%) (n=3 ; *P<0.05).....	104
Tableau 4 : les folds d'expression en comparaison avec les cellules traitées uniquement par 10 µM de diosgénine (n=3 ; #P<0.05).	107



Table des matières

Remerciements	3
Droits d'auteurs	8
Sommaire	9
Liste des abréviations	12
Introduction bibliographique.....	19
Chapitre I. Les leucémies	20
I.1. Physiopathologie des leucémies	20
I.2. Les leucémies myéloïdes aiguës (LMA)	21
I.3. Classification	22
I.4. Traitement	26
Chapitre II. La thérapie de différenciation	28
II.1. Induction de la différenciation par des molécules chimiques :	28
II.2. Induction de la différenciation par des molécules naturelles :	30
Chapitre III. : La différenciation mégacaryocytaire	33
III.1. Définition de la mégacaryocytopoïèse :	33
III.1.1. La polyploidie :	35
III.1.2. La maturation membranaire :	36
III.2. Les stades de la mégacaryocytopoïèse :	39
III.3. Formation et libération des plaquettes :	42
III.3.1. La formation des plaquettes (maturation cytoplasmique) :	42
III.3.2. La libération des plaquettes :	43
III.4. La régulation de la mégacaryocytopoïèse :	45
III.4.1. Les cytokines :	46
III.4.2. Les facteurs de transcription :	49
Chapitre IV. Apoptose ou mort cellulaire programmée	55
IV.1. Le rôle physiologique de l'apoptose	55
IV.2. Les voies d'induction de l'apoptose :	56



IV.2.1. La voie apoptotique intrinsèque (voie mitochondriale) :.....	56
IV.2.1. La voie apoptotique extrinsèque (voie des récepteurs de mort cellulaire) :	57
IV.2.2. Les caspases :.....	57
IV.2.3. La phase d'exécution de l'apoptose :.....	59
IV.2.4. Interaction entre la voie intrinsèque et extrinsèque d'apoptose :.....	59
IV.3. L'apoptose et la différenciation mégacaryocytaire :.....	60
Chapitre V. L'autophagie	65
V.1. Les différents types de l'autophagie :.....	66
V.1.1. Microautophagie :.....	66
V.1.2. Autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) :.....	66
V.1.3. Autophagie à ADN/ARN (RNAutophagie and DNAutophagie) :.....	67
V.1.4. Macroautophagie :.....	67
V.1.4.1. L'initiation :.....	68
V.1.4.2. L'élongation :.....	69
V.1.4.3. La fusion de l'autophagosome avec le lysosome :.....	71
V.2. La régulation de l'autophagie	73
V.2.1. La voie PI3K/Akt/mTORC1.	74
V.2.2. La voie LKB1/AMPK (LKB1 Liver kinase B1/AMP-activated protein kinase, AMPK).....	75
V.2.3. L'interaction entre Bécline-1 et Bcl-2.	75
V.2.4. NF-κB :.....	77
V.3. Autophagie : le paradoxe différenciation/cancer.	80
V.4. La différenciation mégacaryocytaire et l'autophagie :.....	83
Chapitre VI : Un stéroïde végétal : la diosgénine.....	85
VI.1. Diosgénine	85
VI.2. La différenciation mégacaryocytaire et diosgénine :.....	86
Projet de recherche	90
Matériels et méthodes	92
I. LIGNÉE CELLULAIRE :.....	93
II. TRAITEMENTS :	93



III. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES PROTÉINES PAR WESTERN BLOT :...	94
IV. ANALYSE DE LA QUANTITÉ D'ADN (NIVEAU DE PLOÏDIE) PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX :.....	96
V. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE L'ARNm DE GPV (GLYCOPROTÉINE V), UN MARQUEUR DE DIFFÉRENCIATION MÉGACARYOCYTAIRE.	97
VI. ANALYSE QUALITATIVE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN.....	99
VII. ANALYSE STATISTIQUE.....	100
Résultats.....	101
I. Expression des facteurs clés de l'autophagie pendant la différenciation mégacaryocytaire des cellules HEL induite par la diosgénine (Dios) 10 µM.	101
II. Effet de la modulation de l'autophagie sur l'expression des facteurs clés de l'autophagie au cours de la différenciation mégacaryocytaire des cellules HELs.	104
III. Effet de la modulation de l'autophagie sur la polyploïdisation caractéristique de la différenciation mégacaryocytaire (maturation nucléaire).	108
IV. Effet de la modulation de l'autophagie sur l'expression génomique de GpV (glycoprotéine V, maturation membranaire)	112
V. Effet de modulation de l'autophagie sur le taux de la fragmentation d'ADN au cours de la différenciation mégacaryocytaire.	114
Discussion	116
Conclusion et perspective.....	122
Table des illustrations.....	125
Table des tableaux	128
Table des matières	129
Publication	132
Références Bibliographiques.....	142



Involvement of autophagy in diosgenin-induced megakaryocyte differentiation in human erythroleukemia cells

DIMA DIAB¹, ALINE PINON¹, CATHERINE OUK², ROUBA HAGE-SLEIMAN³,
MONA DIAB-ASSAF⁴, BERTRAND LIAGRE^{1*} and DAVID YANNICK LEGER^{1*}

¹PEIRENE Laboratory EA 7500, Faculty of Pharmacy; ²BISCEm Flow Cytometry/Microscopy Unit, University of Limoges, 87025 Limoges, France; ³Department of Biology, Faculty of Sciences; ⁴Doctoral School of Sciences and Technology, Lebanese University, Hadath El Jebbeh, Beyrouth 21219, Lebanon

Received April 20, 2021; Accepted July 21, 2021

DOI: 10.3892/mmr.2021.12386

Abstract. Natural agents have been used to restart the process of differentiation that is inhibited during leukemic transformation of hematopoietic stem or progenitor cells. Autophagy is a housekeeping pathway that maintains cell homeostasis against stress by recycling macromolecules and organelles and plays an important role in cell differentiation. In the present study, an experimental model was established to investigate the involvement of autophagy in the megakaryocyte differentiation of human erythroleukemia (HEL) cells induced by diosgenin [also known as (25*R*)-Spirosten-5-en-3b-ol]. It was demonstrated that Atg7 expression was upregulated from day 1 of diosgenin-induced differentiation and was accompanied by a significant elevation in the conversion of light chain 3 A/B (LC3-A/B)-I to LC3-A/B-II. Autophagy was modulated before or after the induction of megakaryocyte differentiation using 3-methyladenine (3-MA, autophagy inhibitor) and metformin (Met, autophagy initiation activator). 3-MA induced a significant accumulation of the LC3 A/B-II form at day 8 of differentiation. It was revealed that 3-MA had a significant repressive effect on the nuclear (polyploidization) and membrane glycoprotein V [GpV] expression] maturation.

On the other hand, autophagy activation increased GpV genomic expression, but did not change the nuclear maturation profile after HEL cells treatment with Met. It was concluded that autophagy inhibition had a more prominent effect on the diosgenin-differentiated cells than autophagy activation.

Introduction

The differentiation therapy of cancer cells is an alternative therapeutic strategy used to treat leukemia regarding its lower side effects in comparison with the traditional chemotherapy (1,2). Natural agents have been used to restart the process of differentiation which was stopped during leukemic transformation of hematopoietic stem cells or progenitor (3-5). In this context, previously in our laboratory, Beneytout *et al* demonstrated that treating human erythroleukemia (IHEL) cells with 10 μ M of a natural steroidal saponin named diosgenin [(25*R*)-5-spirosten-3b-ol] induced its megakaryocytic differentiation (6). Formerly, published results showed that diosgenin-induced HEL megakaryocytic differentiation is accomplished after 8 days. With time progression, the main features of the megakaryocytic maturation began to stand out as progressive cell enlargement and polyploidization e.g. the increase in the DNA content up to 64N. Some cell receptors expression as CD41, a marker of the megakaryocytic differentiation, appeared and increased continuously until the end of the differentiation with the regression of the erythroid marker glycophorin A (7,8). Many teams in which our laboratory confirmed that the platelet formation from mature megakaryocytes implicates apoptotic signaling pathways and key effectors activation (9-11). However, other researchers reported that the caspase-3, poly-ADP ribose polymerase (PARP) cleavage are not only correlated to the megakaryocyte's fragmentation driven by apoptosis (12,13). In 2006, Leger *et al* demonstrated that, during the initial differentiation stages, diosgenin-treated HEL cells undergo a transient apoptosis-independent caspase-3 activation that could be necessary to start the demarcation membrane system development (9).

Autophagy is a housekeeping pathway that maintains cell homeostasis against stress by recycling macromolecules and organelles and plays an important role in cell development, death, survival, and differentiation. There are different

Correspondence to: Professor Bertrand Liagre, PEIRENE Laboratory EA 7500, Faculty of Pharmacy, University of Limoges, 2 Rue du Docteur Raymond Marcland, 87025 Limoges, France
E-mail: bertrand.liagre@unilim.fr

*Contributed equally

Abbreviations: ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FACS, fluorescence-activated cell sorter; FBS, fetal bovine serum; GpV, glycoprotein V; IHEL, human erythroleukemia; HRP, horseradish peroxidase; LC3A/B, light chain 3 A/B; 3-MA, 3-methyladenine; Met, metformin; MK, megakaryocytes; PBS, phosphate buffered saline; PI, propidium iodide; PVDF, polyvinylidene fluoride

Key words: diosgenin, human erythroleukemia cells, megakaryocyte differentiation, autophagy, 3-methyladenine



types of autophagy: macroautophagy, microautophagy, and chaperone-mediated autophagy. We were interested in macroautophagy in which cytoplasmic materials are going to be enclosed in a double membrane structure called autophagosomes to be recycled and degraded. This autophagy canonical pathway is composed of three parts: the initiation, the elongation, and the autophagosome maturation (14,15). Autophagy is modulated by many chemical molecules, among them 3-methyladenine (3-MA) and metformin (Met). 3-MA is an autophagy inhibitor that will inhibit the PI3K complex III during autophagy. Wu *et al* had demonstrated that the 3-MA is not specific for the PI3K complex III, but it is a selective inhibitor for the PI3K complex family. The principle evidence on the autophagy flux blockage is the accumulation of the form LC3A/B-II (Light chain 3 A/B-II) as evidence of the lysosomal degradation interruption (16). Furthermore, Met is an autophagy initiation activator that plays essentially on the AMPK/LKB1 axis, an activator of the complex ULK1/2 (autophagy initiation complex). On the other hand, Met can abrogate the mTORC1 pathway that mainly regulates the autophagy (17).

Interestingly, in the last few years, scientists started to investigate the role of this second programmed cell death pathway in megakaryocytic differentiation. In 2009, Colosetti *et al* showed that the knockdown of the autophagy key effectors, Beclin1, LC3 abrogated the K562 megakaryocytic differentiation induced by phorbol myristate acetate (18). Cao *et al* confirmed that the complete knockout Atg7^{-/-} mice abrogate the megakaryocytopoiesis and the thrombopoiesis (19). In 2017, Wang *et al* demonstrated that the autophagy inhibition or activation in fetal liver cells but not in mature megakaryocytes altered significantly the megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis (20).

In our present study, we establish an experimental model to investigate the autophagy involvement in the HEL megakaryocytic differentiation induced by the diosgenin. We showed that the autophagy effector's protein expression was changed during the diosgenin-induced megakaryocytic differentiation. We proceed with our investigation by modulating autophagy before and after the differentiation induction to target the maximum of the critical point that affect this procedure. At a late stage of the differentiation, we showed that the autophagy inhibition by 3-MA had a significant repression effect on the nuclear (polyploidization) and membrane (Glycoprotein V (GpV) expression) maturation. On the other hand, autophagy activation increased the GpV genomic expression but did not changed the nuclear maturation profile after HEL cells treatment with Met. Given together, this study demonstrates that autophagy was implicated in the HEL megakaryocytic differentiation induced by diosgenin.

Materials and methods

Materials. RPMI-1640 medium, fetal bovine serum (FBS), L-glutamine and penicillin-streptomycin were purchased from Gibco BRL. Diosgenin [(25*R*)-5-spirosten-3 β -ol], 3-methyladenine (3-MA), metformin (Met) were obtained from Sigma-Aldrich. The monoclonal antibody against Beclin1, Atg7, Atg12-5, Atg3, LC3A/B were acquired from Cell Signaling Technology-Ozyme (Saint-Cyr-L'école,

France). GAPDH antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology-Clinisciences (Nanterre, France). Goat anti-rabbit IgG H&L horseradish peroxidase (HRP) secondary antibody was purchased from Abcam (Paris, France). Rabbit anti-mouse IgG-IgM H&L HRP secondary antibody and propidium iodide (PI) were obtained from Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Inc. Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate was acquired from Merck.

Cell line, cell culture and treatment. The HEL cell line was kindly provided by Professor J.P. Cartron (INSERM U76) (6). Cells were seeded at 10⁵ cells/ml in tissue culture flasks, grown in RPMI-1640 medium (Gibco BRL) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco BRL), 1% sodium pyruvate, 1% HEPES (Gibco BRL), 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. Cultures were maintained in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. Diosgenin is widely used in many pharmacological applications. Diosgenin is soluble in many organic solvents as propyl acetate, acetone, isopropanol, methanol and ethanol. As the literature suggest, diosgenin used on human cancer cells is dissolved in absolute ethanol. With the exception of ethanol at a final concentration of 0.1% in the culture medium, all the other solvents mentioned above cannot be used in cell culture. At 1995, in our laboratory, Beneytout *et al* confirmed that ethanol with a concentration below 0.1% do not induce any differentiation effect (6). In order to induce the megakaryocytic differentiation, the cells were treated with diosgenin 10 μ M after 1 day of seeding and left for 10 days. The same amount of vehicle (<0.1% ethanol) was added to control cells. The autophagy modulation was done by 3-MA (2 mM) and Met (0.25 mM). We pretreated the HEL cells with 3-MA or Met 2 h prior to the differentiation induction by diosgenin (10 μ M) or later at day 2 or day 4 of the differentiation. Then, the cells were harvested at day 1, 2, 4, 6 and 8 of the differentiation, washed twice in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), counted and cell viability was determined by the trypan blue dye exclusion method. Before starting our experiment, we tried to see whether 3-MA and Met induce the megakaryocytic differentiation. There is no difference between the control group (<0.1% ethanol) and the treated group with different concentrations during 24 and 48 h (data not shown). The photos do not reflect any morphological changes comparing to the control group.

RNA extraction and semi-quantitative RT-PCR analysis. Total RNA was isolated from HEL cells with the RNeasy® Mini Kit following the RNA extraction and semi-quantitative RT-PCR manufacturer's protocol (Qiagen). 2 μ g total RNA were retro-transcribed into cDNA using the first-strand cDNA synthesis part of Omniscript RT Kit (Qiagen), oligo-dT (25 μ g) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and RNase Out™ (40 U/ml) (Invitrogen). 2 μ l of reverse-transcribed cDNA was used for PCR according to the Kit HotStar Taq DNA Polymerase (250 units) protocol (Qiagen) with dNTP mix (100 mM) (Invitrogen) and 0.5 μ M of sense and antisense primers. The primers for PCR were chosen to amplify human GpV and we used GAPDH as an internal control. PCR resulting fragments were visualized as previously described (21) by the GBOX (Syngene) and the



Genesnap version 7.09 software. Bands quantification was done by Image J software.

Evaluation of nuclear ploidy. For DNA content analysis for all conditions, 10^6 cells were fixed and permeabilized in 70% ethanol in PBS at -20°C overnight, washed in PBS, treated with RNase (40 U/ μl , Boehringer Mannheim) for 20 min at room temperature, and stained with PI (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Flow cytometric analyses (fluorescence-activated cell sorter (FACS) were performed as described previously (22) (Becton Dickinson FACScalibur). The used software was CellQuest™ pro version 6.0 (Becton Dickinson).

Protein expression analysis. For total protein extraction, control or treated were washed in PBS, then, the total cell pool was centrifuged at 200 g for 5 min at 4°C and homogenized in RIPA lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS, 20 mg/ml of aprotinin) containing protease inhibitors (Complete™ Mini, Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. Protein levels were determined using the Bradford method. Proteins (40–70 μg) were separated by electrophoresis on 10–12% SDS-PAGE gels and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Amersham Pharmacia Biotech). Western blotting was performed on following proteins with respective antibodies against: Beclin1, Atg7, Atg12-5, Atg3, LC3A/B: (1:1,000). After incubation with the appropriate secondary antibodies, blots were developed using the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate and G:BOX system (Syngene) (23) and Genesys version 1.6.1.0 software. The bands density are measured by using Image J software. Membranes were then reblotted with human anti-GAPDH (1:1,000) used as a loading control.

DNA fragmentation. HEL cells were seeded at 10^5 cells/ml in 75 cm^2 tissue culture flasks and then treated as described above. DNA fragmentation was quantified by 'cell death' enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Cytosol extracts were obtained from treated or control cells according to the manufacturer's protocol and DNA fragmentation was measured as previously described (24) by Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Microplate Photometer (ThermoFisher SCIENTIFIC, Illkirch, France).

Statistical analysis. All quantitative results are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of separate experiments using Excel (Microsoft Office, Version 98). Statistical significance was evaluated by the two-tailed unpaired Student's t-test. A P-value of <0.05 was considered to indicate significance.

Results

Autophagy flux is stimulated during diosgenin-induced megakaryocytic differentiation of HEL cells. We first wanted to study the autophagy protein expression during diosgenin-induced megakaryocytic differentiation of HEL cells. We studied the protein expression of different key autophagy mediators (Beclin1, Atg7, Atg12-5, Atg3, LC3A/B-I) and LC3A/B-II at

days 1, 2, 4, 6 and 8 of the differentiation (Fig. 1A). As the Fig. 1A indicates, in comparison with control cells, western blot results showed a significantly higher expression of Atg7 starting from day 1. This pattern continued until the end of diosgenin-induced megakaryocytic differentiation of HEL cells (day 2, 4, 6 and 8, $P<0.05$). In parallel, we did not see any significant changes in the expression of Beclin1, Atg12-5 and Atg3 with the differentiation enhancement. Moreover, we noted a significant increase in the conversion of the form LC3A/B-I to LC3A/B-II at the last four days of the differentiation in comparison with control cells (day 4: 4.7-fold and day 8: 5.3-fold, $P<0.05$) (Fig. 1B). This result showed that the autophagy flux was activated from day 1 after treating HEL with diosgenin and this activation was characterized by the continuously increased expression of autophagy initiation protein Atg7 and the conversion of the form LC3A/B-I to LC3A/B-II, an hallmark of autophagosome maturation.

Autophagy modulation by 3-MA but not Met affects the expression of autophagy mediators at the end of the diosgenin-induced megakaryocytic differentiation of HEL cells. In order to define precisely the autophagy role during megakaryocytic differentiation, we modulated this pathway before and after the HEL cells treatment with diosgenin. The modulation was done by using two molecules that affect the autophagy initiation: Met (activator) and 3-MA (inhibitor). First, we decided to modulate autophagy 2 h before the differentiation induction since we wanted to see if autophagy has any effect on the differentiation beginning in a short term and the maturation in the long term. In the second place, we wanted to modulate autophagy in several time points after the differentiation launch: at day 2 (early stage of differentiation) and day 4 (cells reached a 32N DNA content) (7). As the Fig. 1A illustrates, the autophagy inhibition by 3-MA before or after the HEL treatment with diosgenin inhibited the Atg7 protein expression but not Atg12-5 and Atg3. On days 2 and 4, Atg7 expression reduction was not statistically significant. On day 8, the protein expression of Atg7 was significantly diminished whether the autophagy was inhibited 2 h before the differentiation induction (2.5-fold) or after on day 4 (3.5-fold) in comparison with the cells treated only with diosgenin ($P<0.05$) (Fig. 1B). This abrogation was accompanied with an accumulation of the form LC3A/B-II ($P<0.05$) validating the autophagy flux repression (Fig. 1A and B). However, the autophagy activation by Met did not have any significant effect on the expression of Beclin1, Atg7, Atg12-5, Atg3 and the conversion of LC3A/B-I to LC3A/B-II independently from the treatment time (Fig. 1A and B). Taken together, the autophagy activation did not have any effect on the autophagy protein's expression whether at early or late-stage of the megakaryocytes differentiation. On the other hand, the autophagy inhibition by 3-MA had an impact exclusively at a late stage (day 8) by inhibiting ATG7 expression and accumulating LC3A/B-II.

Autophagy inhibition by 3-MA blocked polyploidization during diosgenin-induced megakaryocytic differentiation where autophagy induction did not affect the polyploidization process. Polyploidy is considered a major marker of the megakaryocytic differentiation by increasing the DNA content up to 128N (25). Polyploidy was used by Léger *et al* (7) to evaluate the megakaryocytic differentiation



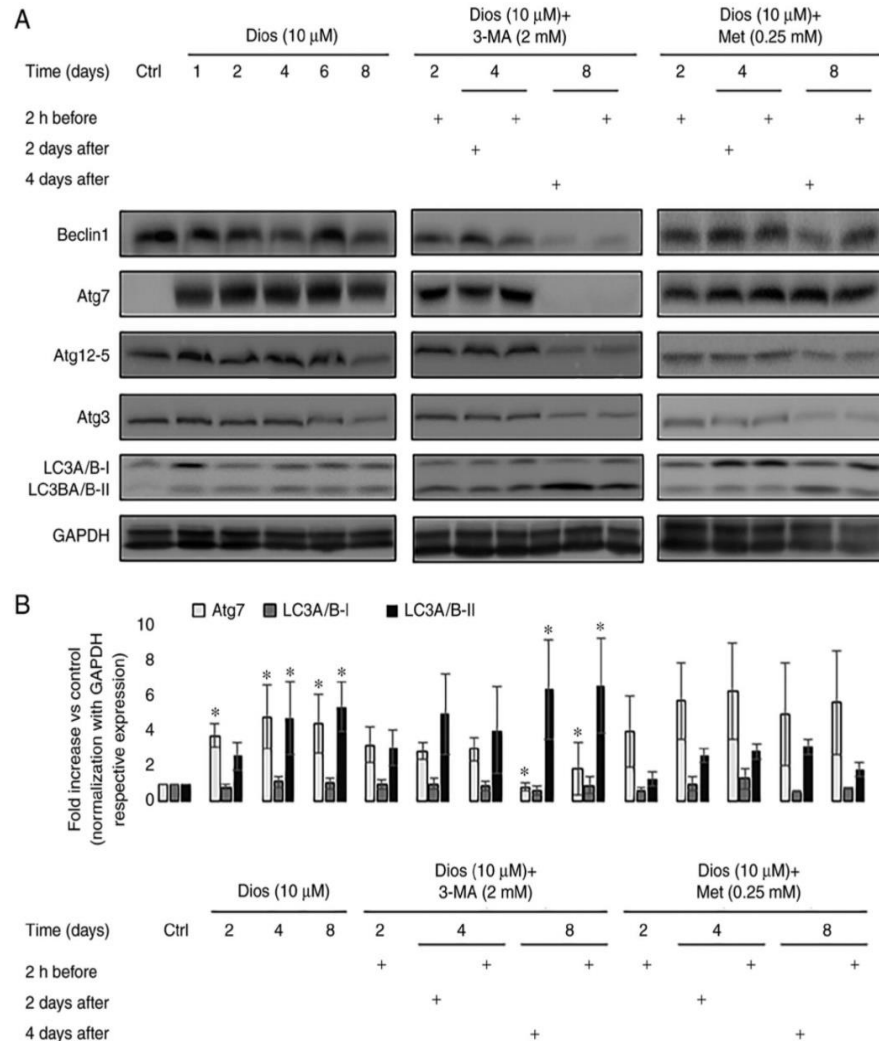


Figure 1. Time-dependent expression of autophagy-related protein expression during diosgenin-induced megakaryocytic differentiation in human erythroleukemia cells and effect of autophagy inhibitor or activator. (A) Beclin1, Atg7, Atg12-5, Atg3 and LC3A/B expression levels were evaluated in the total cellular pool using western blot analysis (GAPDH was used as a loading control and the blot shown is representative of three separate experiments). (B) The fold increase values are expressed as the mean $\pm$ SEM (n=3). *P<0.05 vs. ctrl group. Dios, diosgenin; LC3A/B, light chain 3 A/B; Ctrl, control; 3-MA, 3-methyladenine; Met, metformin.

of HEL cells after treatment with diosgenin. Polyploidy in the diosgenin-differentiated cells reach out 64N at the end of the differentiation (day 8) (7). Based on this, we evaluated the polyploidization in the diosgenin-differentiated cells after autophagy modulation by 3-MA or Met. The results in Fig. 2 show that the autophagy inhibition by 3-MA reduced polyploidization at day 4 and 8 of the differentiation but not at an early stage (day 2). Moreover, on day 4 and 8, we observed a strong inhibition of the polyploidy if the HEL cells were 2 h pre-treated by 3-MA (55% and 45% of inhibition respectively vs. the cells treated only with diosgenin on days 4 and 8). These inhibition rates were significantly higher

in comparison with the cells in which the autophagy was inhibited after the differentiation induction (day 2 or day 4) by diosgenin (33% and 22% of inhibition respectively vs. the cells treated only with diosgenin at day 4 and 8). On the contrary, independently from the treatment time, autophagy activation by Met did not had any impact on the polyploidization (Fig. 2). Collectively, these results demonstrated a strong autophagy inhibition effect on polyploidy on day 4 and 8, which is not the case after autophagy activation.

Autophagy inhibition blocked GpV transcription where autophagy induction increased GpV transcription during

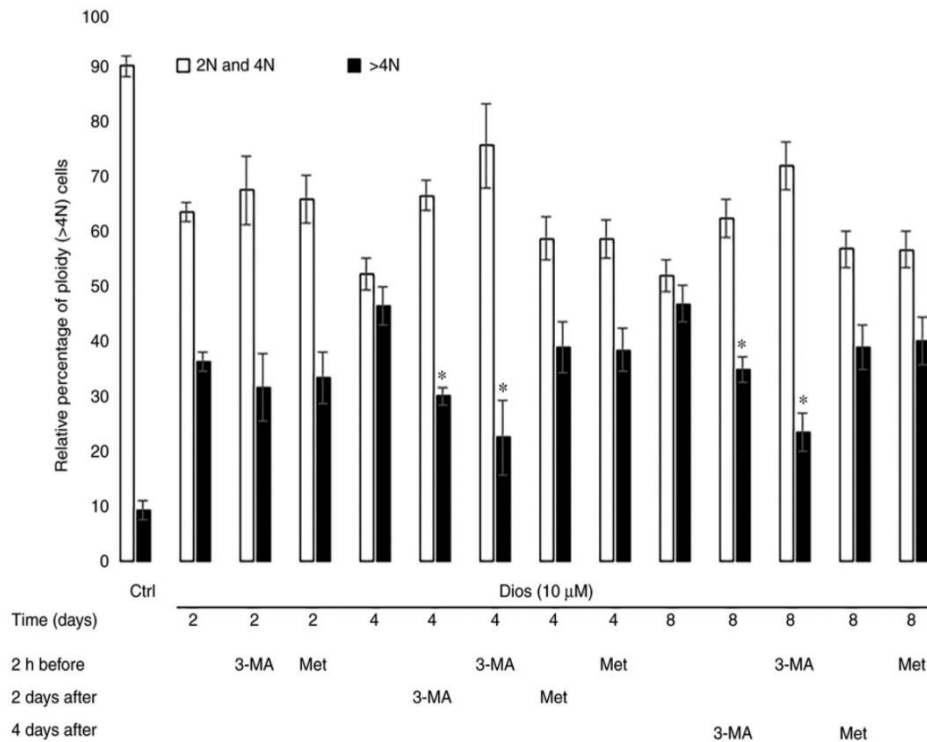


Figure 2. Effect of autophagy inhibitor or activator on cell ploidy during diosgenin-induced megakaryocyte differentiation in human erythroleukemia cells. Relative percentage of nuclear ploidy classes were determined by flow cytometry and values are expressed as the mean $\pm$ SEM (n=3). *P<0.05 vs. dios alone group (>4N). Dios, diosgenin; Ctrl, control; 3-MA, 3-methyladenine; Met, metformin.

diosgenin-induced megakaryocytic differentiation. The next step was to see the effect of the autophagy modulation on the megakaryocytes membrane receptor expression. GpV was used to identify the maturation level after the induction of HEL cells megakaryocytic differentiation by diosgenin (7). As the Fig. 3 demonstrates, 3-MA induced a dramatic decrease in GpV transcription during diosgenin-induced megakaryocytic differentiation (Fig. 3A). This decrease occurred after 4 days of diosgenin-induced differentiation, regardless of the treatment time at which 3-MA was added (2-fold 2 days after and 9-fold 2 h before, P<0.05) (Fig. 3B). This decrease was even more drastic (>13-fold, P<0.05) at the end of differentiation and was correlated with the decrease observed in polyploidization process after 3-MA treatment (Figs. 2 and 3).

Concerning the effect of autophagy induction, we observed that Met induced an increase in GpV transcription during diosgenin-induced megakaryocytic differentiation. This increase started after 4 days of diosgenin-induced differentiation and lasted until the end of the treatment (day 8) regardless of the treatment time at which Met was added (1.6-fold and 1.7-fold, P<0.05) (Fig. 3A and B).

The autophagy flux modulation by 3-MA or Met does not affect DNA fragmentation of HEL cells. In 2002, De Botton *et al* reported that during the early stage of the megakaryocytic differentiation, caspase-3 activity was detected but not related

to any DNA fragmentation signal (12). Here, we investigated the effect of autophagy modulation during the megakaryocytic differentiation of HEL cells induced by diosgenin on DNA fragmentation. As the Fig. 4 demonstrates, the DNA fragmentation fold increase compared to control cells starting from day 2 to the end of the treatment. As the Fig. 4A and B report, the autophagy modulation 2 h before or on day 2 or day 4 after the HEL cells treatment with diosgenin did not significantly changed DNA fragmentation process.

Discussion

Most of the anti-cancer treatments aimed to induce cancer cell cytotoxicity. Recently, cancer cell differentiation is considered as an additional choice to eradicate cancer cells. Talking about leukemia, differentiation therapy had been studied by many teams. Several molecules are engaged in this context and many of them are natural compounds such as retinoic acid (26). In our laboratory, the diosgenin-induced megakaryocytic differentiation of HEL cells had been studied since 1995 by Beneytout *et al* (6). Léger *et al* investigated the molecular mechanisms induced after HEL cells treatment with diosgenin. According to these works, apoptosis is indispensable for mature megakaryocyte's fragmentation and pseudo-platelet release *in vitro* (7-9). Recently, the implication of the autophagy pathway during the megakaryocytic

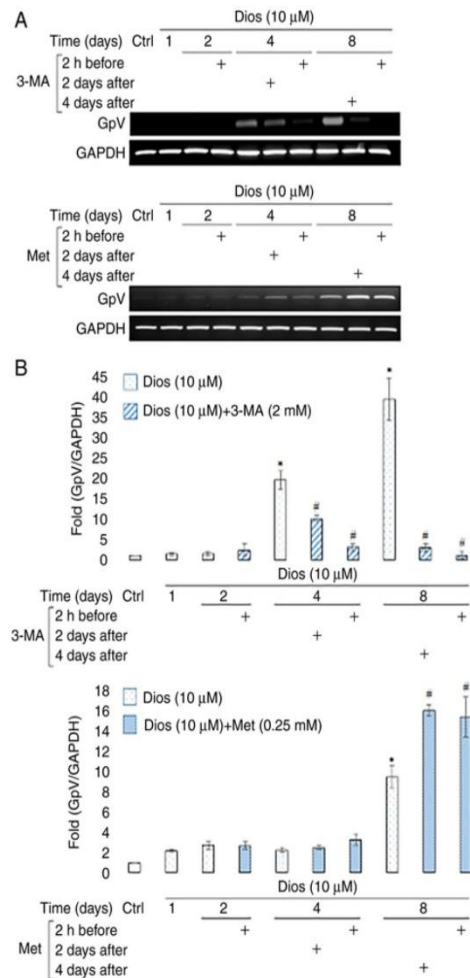


Figure 3. Effect of autophagy inhibitor or activator on GpV mRNA expression during diosgenin-induced megakaryocyte differentiation in human erythroleukemia cells. (A) Reverse transcription-semi-quantitative PCR analysis was performed after total RNA extraction and semi-quantification of GpV transcripts using GAPDH as an internal control. Agarose gels shown are representative of three separate experiments. (B) The fold ratios are expressed as the mean $\pm$ SEM (n=5). *P<0.05 vs. ctrl group; #P<0.05 vs. dios group. Dios, diosgenin; Ctrl, control; 3-MA, 3-methyladenine; Met, metformin; GpV, glycoprotein V.

differentiation had been discussed by the scientific community (18,19,27). This assumption was built on the existence of common regulatory pathways between those two procedures. A study conducted by Cao *et al* demonstrated that Atg7 knockout in mice impaired the megakaryocytic differentiation and altered the thrombopoiesis (19). During the same year, an additional study by Ouseph *et al* confirmed that the Atg7 knockdown in mature megakaryocytes does not have any effect on it (27). Autophagy's precise role during the megakaryocytic differentiation remain poorly understood and needs more investigations to be clarified.

Autophagy is a homeostatic pathway aiming to recycle the cytosolic content in cells (14). Since 1970, many

pathologies linked to megakaryocytes as TTP (immune thrombocytopenia) describe the occurrence of autophagy vacuoles in those cells (28). We are interested in macro-autophagy. This non-selective process implicates several Atgs that will make two ubiquitin-like conjugation systems consisted of Atg7, Atg10, Atg12, Atg5, Atg16L1 and Atg3. Atgs will conjugate LC3A/B-I to phosphatidylethanolamine on the autophagosome membrane and induce its enclosure (14). Our first step was to see the key autophagy mediator's protein expressions. We demonstrated that Atg7 expression is overexpressed since day 1 after the differentiation induction by diosgenin and was accompanied by a significant elevation of the LC3-A/B-I conversion to LC3-A/B-II. This first result demonstrates that the autophagy flux is active during the diosgenin-induced megakaryocytic differentiation of HEL cells. Given that the Atg3 and Atg12-5 protein expressions were unchanged during the diosgenin-induced megakaryocytic differentiation, the autophagy non-canonical pathway (a pathway independent from Beclin1, Atg12-5 and Atg3) could be activated but this hypothesis remains under investigation. A published study in 2009 by Colosetti *et al* mentioned that the autophagy genes (Beclin1 and LC3) knockdown in K562 cells impeded the induced megakaryocytic differentiation marker CD41' (Glycoprotein II-B) (18). Moreover, a study conducted by Huang *et al* in 2011 reported that the autophagy inhibition by 3-MA altered the lapatinib-induced megakaryocytic differentiation of K562 cells (29). Recently, a published article by Wang *et al* confirmed previous studies by demonstrating that the autophagy modulation by bafilomycin A1 (autophagy inhibitor) and rapamycin (mTORC1 inhibitor) in fetal liver cells abrogated the polyploidy as well as the expression of the principle megakaryocytic maturation markers (20). However, autophagy modulation in mature megakaryocytes does not affect these parameters (20). In our present study, we modulated autophagy before or after the megakaryocytic differentiation induction by using Met and 3-MA. We have mentioned that Met is never been used in the megakaryocytic differentiation study field. We noted that Met did not have any significant effect on the autophagy flux in the diosgenin-differentiated cells independently from the treatment strategy. This is normal to be reflected on the GpV expression. There is no difference between the polyploidy and the GpV genomic expression after autophagy activation at the second and the fourth day of differentiation. Thus, the autophagy activation by Met in our study did not induce a statistically significant accumulation of the LC3A/B-II in HEL cells, indicating the necessity to use another activator agent to decide if this is the case in our cell line. Further, to explain the Met behavior in our case, additional investigations should be done regarding the detection of AMPK/LKB1 axis and phospho-Akt status.

However, 3-MA induced a significant accumulation of the form LC3 A/B-II at day 8 of the differentiation and not before. It is important to note that 3-MA is a selective PI3K complex family inhibitor (16) therefore, more investigations should be done regarding the PI3K/mTORC1/Akt axis since mTORC1 is essential for the megakaryocytic differentiation (30). In order to see the effect of these observations on the megakaryocytic differentiation, we examined the nuclear maturation (polyploidy) of the diosgenin-differentiated megakaryocytes. In mature megakaryocytes, the polyploidy

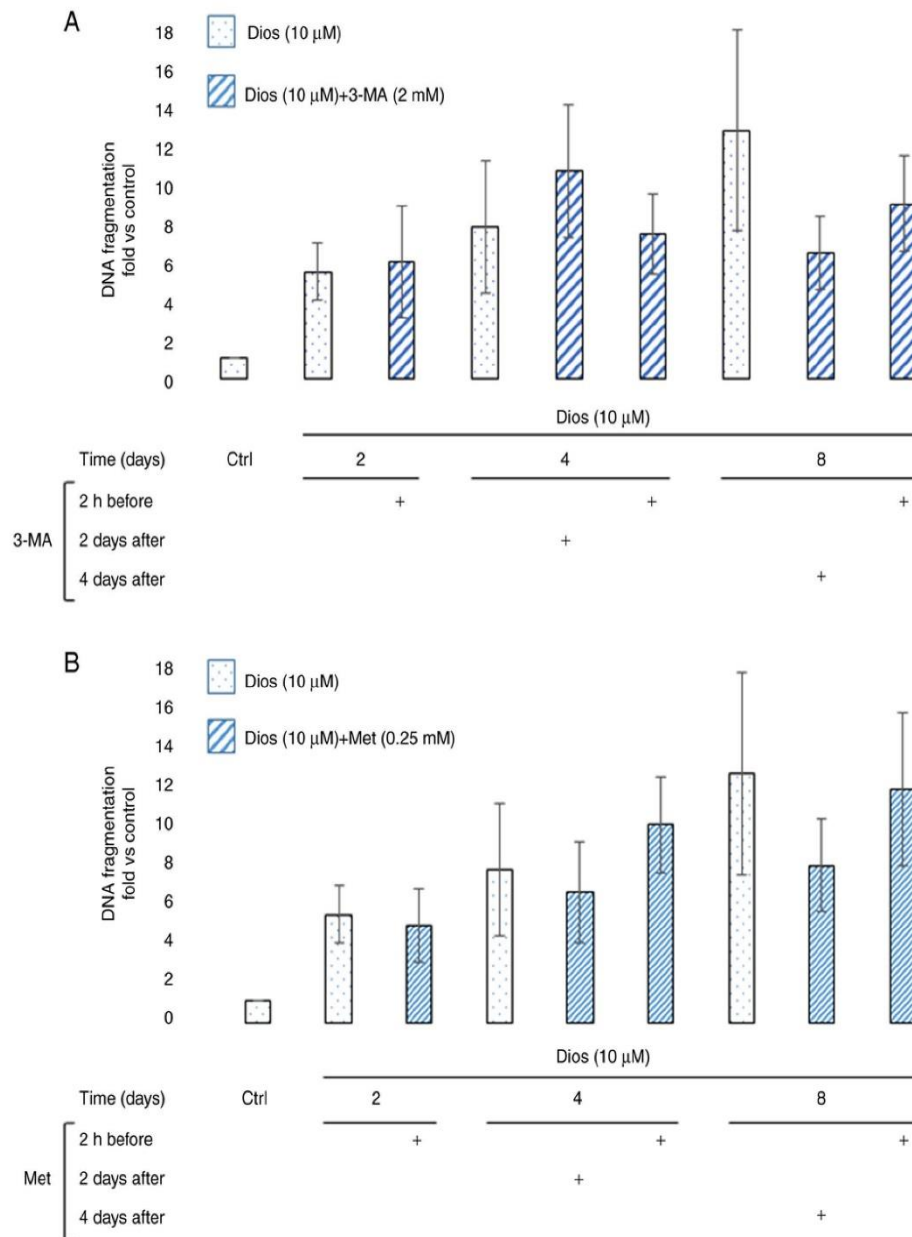


Figure 4. Effect of autophagy (A) inhibitor or (B) activator on DNA fragmentation during diosgenin-induced megakaryocytic differentiation in human erythroleukemia cells. DNA fragmentation was quantified from cytosol extracts by ELISA. Results are reported as n-fold compared with the control. Data are shown as the mean $\pm$ SEM (n=3). Dios, diosgenin; Ctrl, control; 3-MA, 3-methyladenine; Met, metformin.

rate could reach 128N and its importance lies in the cell size enlargement and platelet formation (25). In 2006, Drayer *et al* reported that the autophagy activation by rapamycin in MO7c cells and human megakaryocytic primary progenitors does not affect the megakaryocytic polyploidization after the treatment with thrombopoietin (31). Another published work in 2020 by Sun *et al* reports that the autophagy activation by rapamycin in TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate)-differentiated megakaryocytes from Dami cells increased significantly the

polyploidy in a dose-dependent manner (32). Nevertheless, the autophagy inhibition by bafilomycin A1 inhibits the polyploidy (32). In this paper, we demonstrated that megakaryocytes are insensitive to the autophagy modulation on day 2 as the polyploidy rate did not change after modulating autophagy 2 h before the differentiation induction. On days 4 and 8, Met continues to show no effect on the polyploidization independently from the treatment time. Met did not affect the key autophagy mediator's protein expression so this is might

be reflected by the absence of the effect on the polyploidy on days 2, 4 and 8. On the other side, 3-MA inhibited the nuclear maturation of the diosgenin-induced megakaryocytes at days 4 and 8 whatever is the treatment time. This effect is stronger if the autophagy is inhibited 2 h before the treatment of HEL cells with diosgenin, which is compatible with the above-mentioned studies. According to the literature, the autophagy depletion in the megakaryocytic progenitors impedes the megakaryocytic differentiation. According to Léger *et al.*, after 5 min of diosgenin treatment, the cell signaling is modulated toward the differentiation (7). Our results suggested that the autophagy inhibition effect appears strongly at day 4 and not before. The role of autophagy is to ensure that the cells are in a good percentage of polyploidy. With a high polyploidy rate, the cells are able to produce all the necessary materials to launch the platelet formation. The role of autophagy in the platelet formation during the diosgenin induced megakaryocytic differentiation needs to be investigated as apoptosis is involved during this stage. According to Léger *et al.* on day 2 of differentiation, a caspase-3 activity peak is observed as a sign of the platelet formation initiation inside the differentiated megakaryocytes. Furthermore, they showed an increase in the cleaved PARP expression and a reduction in the phospho-ERK1/2 activity (7,9).

The majority of the studies focus on the expression of CD41⁺ and CD61⁺ to characterize the megakaryocytic differentiation. However, GpV is a specific marker of the megakaryocytic lineages described since 1994 (33). According to this publication, the GpV expression increase while the megakaryocytic differentiation progression. In 2006, Léger *et al.* presented GpV as a marker of the diosgenin-induced megakaryocytic differentiation of HEL cells (8). According to this study, GpV will increase progressively with the differentiation enhancement (8). Here in our study, we measured the GpV genomic expression to evaluate the autophagy modulation effect on the megakaryocytic differentiation. As claimed by Sun *et al.*, the activation of the autophagy flux by rapamycin in TPA-differentiated megakaryocytes increased the % of CD41⁺ megakaryocytes (MK) (32). Liu *et al.* in 2011 demonstrated that neonatal MKs (micro MKs) can achieve full maturation and a mature membrane receptor profile with a low polyploidy level (4N) (34). In our report, we demonstrated that the autophagy activation by Met before and after the megakaryocytic differentiation induce the genomic expression of GpV despite of the ineffectiveness of the autophagy activation on the diosgenin-differentiated cell's polyploidy and independently from the treatment strategy. It is interesting to note that autophagy inhibition with 3-MA reduced both membrane maturation (GpV) and polyploidization and that autophagy induction with Met promoted only membrane maturation (GpV) and not polyploidization.

In 2000, Falcieri *et al.* demonstrated that megakaryocytes from late stages of differentiation did not show any signal of DNA fragmentation (35). Using electrophoresis analysis, they suggested that DNA fragmentation was not internucleosomal like the majority of the hematopoietic cell lines that undergo apoptosis thus the DNA fragments did not appear on the agarose gel (35). In 2002, De Botton *et al.* reported an early caspase-3 activity localized in the cytosol and independent from apoptosis as it did not lead to DNA fragmentation (12).

Otherwise, in later stages of the megakaryocytic differentiation, the DNA fragmentation increased with diffused caspase-3 inside the cells (12). In 2018, a TUNEL assay done on histological cut belonged to immune thrombocytopenia patients demonstrated the absence of DNA fragmentation signals in fully mature megakaryocytes (36). Here in this report, the DNA fragmentation assay showed no statistical significant variation of the DNA fragmentation in the cells treated only with diosgenin or the cells that underwent autophagy modulation.

In conclusion, this study demonstrated for the first time the autophagy implication in the diosgenin-induced megakaryocytic differentiation of HEL cells. The autophagy implication during the megakaryocytic differentiation was studied after the modulation of this pathway by 3-MA and Met. We conclude that the autophagy modulation induced an effect on the diosgenin-induced megakaryocytic differentiation. It is interesting to note that autophagy inhibition with 3-MA reduced both membrane maturation and polyploidization and that autophagy induction with Met promoted only membrane maturation and not polyploidization.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Dr Ludovic Bretin and Miss Lucie Paulus (University of Limoges, Limoges, France) for their technical assistance during the experiments. The authors would also like to thank Dr Jeanne Cook-Moreau (University of Limoges, Limoges, France) for their help with manuscript editing.

Funding

The present study was funded in part by the Ministry of Higher Education, Research and Innovation by the New Aquitaine Regional Council and by the Lebanese University of Beirut (Beirut, Lebanon).

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

DYL participated in research design. DD, AP and CO conducted the experiments. DD, BL and DYL performed data analysis. DD, BL and DYL wrote or contributed to the writing of the manuscript. RHS and MDA obtained doctoral funding and contributed to the design of the research. DYL and BL confirm the authenticity of all the raw data. All authors have read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Patient consent for publication

Not applicable.





Références Bibliographiques

1. Piller GJ. Leukaemia – a brief historical review from ancient times to 1950. *Br J Haematol*. 2001;112(2):282-92.
2. Schultz M. Rudolf Virchow. *Emerg Infect Dis*. sept 2008;14(9):1480-1.
3. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 19 mai 2016;127(20):2391-405.
4. Mertelsmann R, Engelhardt M. Précis d'hématologie et d'oncologie [Internet]. Paris: Springer Paris; 2011 [cité 1 mai 2020]. Disponible sur: <http://dx.doi.org/10.1007/978-2-287-99342-8>
5. Short NJ, Rytting ME, Cortes JE. Acute myeloid leukaemia. *The Lancet*. août 2018;392(10147):593-606.
6. Rubnitz JE, Gibson B, Smith FO. Acute Myeloid Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. févr 2010;24(1):35-63.
7. Raffoux E. Leucémies aiguës myéloïdes. 2011;3.
8. Creutzig U, van den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B, Dworzak MN, Adachi S, de Bont E, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood*. 18 oct 2012;120(16):3187-205.
9. Tassara M, Döhner K, Brossart P, Held G, Götze K, Horst HA, et al. Valproic acid in combination with all-trans retinoic acid and intensive therapy for acute myeloid leukemia in older patients. *Blood*. 26 juin 2014;123(26):4027-36.
10. Andresen V, Gjertsen BT. Drug Repurposing for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Front Med*. 29 nov 2017;4:211.
11. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 4 mars 2011;144(5):646-74.
12. Yan M, Liu Q. Differentiation therapy: a promising strategy for cancer treatment. *Chin J Cancer* [Internet]. 6 janv 2016 [cité 11 mai 2020];35. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4704415/>



13. Leger D, Liagre B, Beneytout J-L. Role of MAPKs and NF- κ B in diosgenin-induced megakaryocytic differentiation and subsequent apoptosis in HEL cells. *Int J Oncol.* 1 févr 2006;28:201-7.
14. Shao G, Lai W, Wan X, Xue J, Wei Y, Jin J, et al. Inactivation of EGFR/AKT signaling enhances TSA-induced ovarian cancer cell differentiation. *Oncol Rep.* mai 2017;37(5):2891-6.
15. The Anti-Warburg Effect Elicited by the cAMP-PGC1 α Pathway Drives Differentiation of Glioblastoma Cells into Astrocytes. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 11 mai 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28076790>
16. Chen Y, Cao J, Zhang N, Yang B, He Q, Shao X, et al. Advances in differentiation therapy for osteosarcoma. *Drug Discov Today.* mars 2020;25(3):497-504.
17. Zhang P-P, Wang P-Q, Qiao C-P, Zhang Q, Zhang J-P, Chen F, et al. Differentiation therapy of hepatocellular carcinoma by inhibiting the activity of AKT/GSK-3 β / β -catenin axis and TGF- β induced EMT with sophocarpine. *Cancer Lett.* 28 2016;376(1):95-103.
18. Lei X-X, Liu Y, Wang J-X, Cai Q, Yan M, He H-P, et al. SOX1 promotes differentiation of nasopharyngeal carcinoma cells by activating retinoid metabolic pathway. *Cell Death Dis.* 7 mai 2020;11(5):331.
19. Gocek E, Marcinkowska E. Differentiation Therapy of Acute Myeloid Leukemia. *Cancers.* 16 mai 2011;3(2):2402-20.
20. Emerit I, Cerutti PA. Tumor promoter phorbol 12-myristate 13-acetate induces a clastogenic factor in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* déc 1982;79(23):7509-13.
21. Lee CW, Sokoloski JA, Sartorelli AC, Handschumacher RE. Induction of the differentiation of HL-60 cells by phorbol 12-myristate 13-acetate activates a Na(+)-dependent uridine-transport system. Involvement of protein kinase C. *Biochem J.* 15 févr 1991;274(Pt 1):85-90.
22. Walz TM, Malm C, Nishikawa BK, Willander K, Wingren S, Wasteson A. Production of transforming growth factor alpha by human leukemia cells (HL-60 and U-937) during monocytic differentiation. *Leukemia.* avr 1995;9(4):671-6.
23. Chaman N, Iqbal MA, Siddiqui FA, Gopinath P, Bamezai RNK. ERK2-Pyruvate Kinase Axis Permits Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-induced Megakaryocyte Differentiation in K562 Cells. *J Biol Chem.* 25 sept 2015;290(39):23803-15.
24. Zauli G, Bassini A, Catani L, Gibellini D, Celeghini C, Borgatti P, et al. PMA-induced megakaryocytic differentiation of HEL cells is accompanied by striking



- modifications of protein kinase C catalytic activity and isoform composition at the nuclear level. *Br J Haematol.* mars 1996;92(3):530-6.
25. Isakari Y, Sogo S, Ishida T, Kawakami T, Ono T, Taki T, et al. Gene expression analysis during platelet-like particle production in phorbol myristate acetate-treated MEG-01 cells. *Biol Pharm Bull.* mars 2009;32(3):354-8.
 26. Pinto A, Attadia V, Fusco A, Ferrara F, Spada OA, Di Fiore PP. 5-Aza-2'-deoxycytidine induces terminal differentiation of leukemic blasts from patients with acute myeloid leukemias. *Blood.* oct 1984;64(4):922-9.
 27. Christman JK, Mendelsohn N, Herzog D, Schneiderman N. Effect of 5-azacytidine on differentiation and DNA methylation in human promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Cancer Res.* févr 1983;43(2):763-9.
 28. Cao H, Xu Y, de Necochea-Campion R, Baylink DJ, Payne KJ, Tang X, et al. Application of vitamin D and vitamin D analogs in acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol.* juin 2017;50:1-12.
 29. Savickiene J, Treigyte G, Jonusiene V, Bruzaite R, Borutinskaite V-V, Navakauskienė R. Epigenetic changes by zebularine leading to enhanced differentiation of human promyelocytic leukemia NB4 and KG1 cells. *Mol Cell Biochem.* janv 2012;359(1-2):245-61.
 30. Tang L, Chai W, Ye F, Yu Y, Cao L, Yang M, et al. HMGB1 promotes differentiation syndrome by inducing hyperinflammation via MEK/ERK signaling in acute promyelocytic leukemia cells. *Oncotarget.* 17 févr 2017;8(16):27314-27.
 31. Noh E-K, Kim H, Park MJ, Baek JH, Park J-H, Cha SJ, et al. Gefitinib enhances arsenic trioxide (AS₂O₃)-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cell line. *Leuk Res.* nov 2010;34(11):1501-5.
 32. (1) 3-Deazauridine (NSC 126849): an interesting modulator of biochemical response [Internet]. ResearchGate. [cité 15 mai 2020]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/20734246_3-Deazauridine_NSC_126849_an_interesting_modulator_of_biochemical_response
 33. Peng H-Y, Liao H-F. Staurosporine induces megakaryocytic differentiation through the upregulation of JAK/Stat3 signaling pathway. *Ann Hematol.* sept 2011;90(9):1017-29.
 34. di Martino O, Welch JS. Retinoic Acid Receptors in Acute Myeloid Leukemia Therapy. *Cancers* [Internet]. 1 déc 2019 [cité 10 mai 2020];11(12). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6966485/>
 35. Fredly H, Gjertsen BT, Bruserud Ø. Histone deacetylase inhibition in the treatment of acute myeloid leukemia: the effects of valproic acid on leukemic



cells, and the clinical and experimental evidence for combining valproic acid with other antileukemic agents. *Clin Epigenetics*. 30 juill 2013;5(1):12.

36. Trécul A, Morceau F, Gaigneaux A, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M. Valproic acid regulates erythro-megakaryocytic differentiation through the modulation of transcription factors and microRNA regulatory micro-networks. *Biochem Pharmacol*. 15 nov 2014;92(2):299-311.
37. Dhenge A, Kuhikar R, Kale V, Limaye L. Regulation of differentiation of MEG01 to megakaryocytes and platelet-like particles by Valproic acid through Notch3 mediated actin polymerization. *Platelets*. 18 août 2019;30(6):780-95.
38. Kim M, Mirandola L, Pandey A, Nguyen DD, Jenkins MR, Turcel M, et al. Application of vitamin D and derivatives in hematological malignancies. *Cancer Lett*. 1 juin 2012;319(1):8-22.
39. Hughes PJ, Marcinkowska E, Gocek E, Studzinski GP, Brown G. Vitamin D3-driven signals for myeloid cell differentiation - Implications for differentiation therapy. *Leuk Res*. mai 2010;34(5):553-65.
40. Steiner M, Priel I, Giat J, Levy J, Sharoni Y, Danilenko M. Carnosic acid inhibits proliferation and augments differentiation of human leukemic cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Nutr Cancer*. 2001;41(1-2):135-44.
41. Camagna A, Testa U, Masciulli R, Barberi T, Samoggia P, Tritarelli E, et al. The synergistic effect of simultaneous addition of retinoic acid and vitamin D3 on the in-vitro differentiation of human promyelocytic leukemia cell lines could be efficiently transposed in vivo. *Med Hypotheses*. mars 1998;50(3):253-7.
42. Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, Ni L, Koeffler HP, Yokoyama A. Inhibition of mTORC1 by RAD001 (everolimus) potentiates the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 to induce growth arrest and differentiation of AML cells in vitro and in vivo. *Exp Hematol*. 1 août 2010;38(8):666-76.
43. Kumagai T, O'Kelly J, Said JW, Koeffler HP. Vitamin D2 analog 19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D2: antitumor activity against leukemia, myeloma, and colon cancer cells. *J Natl Cancer Inst*. 18 juin 2003;95(12):896-905.
44. Ferrero D, Campa E, Dellacasa C, Campana S, Foli C, Boccadoro M. Differentiating agents + low-dose chemotherapy in the management of old/poor prognosis patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. mai 2004;89(5):619-20.
45. Hellström E, Robèrt K-H, Gahrton G, Mellstedt H, Lindemalm C, Einhorn S, et al. Therapeutic effects of low-dose cytosine arabinoside, alpha-interferon, 1 α -hydroxyvitamin D3 and retinoic acid in acute leukemia and myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol*. 1988;40(5):449-59.



46. Erben RG, Zeitz U, Weber K, Stierstorfer B, Wolf G, Schmahl W, et al. A non-functioning vitamin D receptor predisposes to leukaemoid reactions in mice. *Hematol Oncol.* 2010;28(4):185-91.
47. Slapak CA, Desforbes JF, Fogaren T, Miller KB. Treatment of acute myeloid leukemia in the elderly with low-dose cytarabine, hydroxyurea, and calcitriol. *Am J Hematol.* 1992;41(3):178-83.
48. Siitonen T, Timonen T, Juvonen E, Terävä V, Kutila A, Honkanen T, et al. Valproic acid combined with 13-cis retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the treatment of patients with myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* août 2007;92(8):1119-22.
49. Akiyama N, Miyazawa K, Kanda Y, Tohyama K, Omine M, Mitani K, et al. Multi-center phase II trial of vitamin K(2) monotherapy and vitamin K(2) plus 1alpha-hydroxyvitamin D(3) combination therapy for low-risk myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* sept 2010;34(9):1151-7.
50. Paubelle E, Zylbersztejn F, Alkhaeir S, Suarez F, Callens C, Dussiot M, et al. Deferasirox and Vitamin D Improves Overall Survival in Elderly Patients with Acute Myeloid Leukemia after Demethylating Agents Failure. *PLoS ONE* [Internet]. 20 juin 2013 [cité 16 mai 2020];8(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3688707/>
51. Yen J-H, Lin C-Y, Chuang C-H, Chin H-K, Wu M-J, Chen P-Y. Nobiletin Promotes Megakaryocytic Differentiation through the MAPK/ERK-Dependent EGR1 Expression and Exerts Anti-Leukemic Effects in Human Chronic Myeloid Leukemia (CML) K562 Cells. *Cells.* 3 avr 2020;9(4).
52. Satoru Kawaii, Yasuhiko Tomono, Eriko Katase, Kazunori Ogawa and, Yano* M. HL-60 Differentiating Activity and Flavonoid Content of the Readily Extractable Fraction Prepared from Citrus Juices [Internet]. American Chemical Society; 1998 [cité 14 mai 2020]. Disponible sur: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf9805101>
53. Yang J, Qiu J, Hu Y, Zhang Y, Chen L, Long Q, et al. A natural small molecule induces megakaryocytic differentiation and suppresses leukemogenesis through activation of PKC δ /ERK1/2 signaling pathway in erythroleukemia cells. *Biomed Pharmacother.* 1 oct 2019;118:109265.
54. Howell WH. Observations upon the occurrence, structure, and function of the giant cells of the marrow. *J Morphol.* 1890;4(1):117-30.
55. The Origin and Nature of the Blood Plates | NEJM [Internet]. [cité 15 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM190606071542301>



56. Bunting CH. BLOOD-PLATELET AND MEGALOKARYOCYTE REACTIONS IN THE RABBIT. *J Exp Med.* 17 juill 1909;11(4):541-52.
57. The development of the megakaryocyte in adult mice - Potter - 1940 - The Anatomical Record - Wiley Online Library [Internet]. [cité 15 juin 2020]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ar.1090770108>
58. Thiery JP, Bessis M. [Mechanism of platelet genesis; in vitro study by cinemicrophotography]. *Rev Hematol.* mai 1956;11(2):162-74.
59. Yamada E. The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat (Basel).* 1957;29(3):267-90.
60. Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood.* 23 avr 2015;125(17):2605-13.
61. Machlus KR, Italiano JE. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol.* 10 juin 2013;201(6):785-96.
62. Ru Y-X, Zhao S-X, Dong S-X, Yang Y-Q, Eyden B. On the Maturation of Megakaryocytes: A Review with Original Observations on Human In Vivo Cells Emphasizing Morphology and Ultrastructure. *Ultrastruct Pathol.* 4 mars 2015;39(2):79-87.
63. Pietrzyk-Nivau A. Génération de plaquettes in vitro à partir de cellules souches hématopoïétiques [Internet]. undefined. 2014 [cité 9 févr 2021]. Disponible sur: </paper/G%C3%A9n%C3%A9ration-de-plaquettes-in-vitro-%C3%A0-partir-de-Pietrzyk-Nivau/85d333564bf9465e76da6e233c53dbaabe2f1cdf>
64. Ravid K, Lu J, Zimmet JM, Jones MR. Roads to polyploidy: The megakaryocyte example. *J Cell Physiol.* 2002;190(1):7-20.
65. Geddis AE, Fox NE, Tkachenko E, Kaushansky K. Endomitotic Megakaryocytes that Form a Bipolar Spindle Exhibit Cleavage Furrow Ingression Followed by Furrow Regression. *Cell Cycle.* 15 févr 2007;6(4):455-60.
66. Lordier L, Jalil A, Aurade F, Larbret F, Larghero J, Debili N, et al. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood.* 15 oct 2008;112(8):3164-74.
67. Nagata Y, Muro Y, Todokoro K. Thrombopoietin-induced Polyploidization of Bone Marrow Megakaryocytes Is Due to a Unique Regulatory Mechanism in Late Mitosis. *J Cell Biol.* 20 oct 1997;139(2):449-57.



68. Vitrat N, Cohen-Solal K, Pique C, Le Couedic JP, Norol F, Larsen AK, et al. Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis. *Blood*. 15 mai 1998;91(10):3711-23.
69. Papadantonakis N, Makitalo M, McCrann D, Liu K, Nguyen H, Martin G, et al. Direct visualization of the endomitotic cell cycle in living megakaryocytes: Differential patterns in low and high ploidy cells. *Cell Cycle*. 1 août 2008;7(15):2352-6.
70. Vainchenker W, Guichard J, Breton-Gorius J. [Differentiation of human megakaryocytes in culture starting from the primordial circulating cells in the newborn]. *Comptes Rendus Hebd Seances Acad Sci Ser Sci Nat*. 17 juill 1978;287(3):177-9.
71. Vainchenker W, Raslova H. Megakaryocyte polyploidization: role in platelet production. *Platelets*. 22 sept 2019;1-10.
72. Mazzi S, Lordier L, Debili N, Raslova H, Vainchenker W. Megakaryocyte and polyploidization. *Exp Hematol*. 2018;57:1-13.
73. Zimmet J, Ravid K. Polyploidy: Occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp Hematol*. 1 janv 2000;28(1):3-16.
74. Vainchenker W, Raslova H. Megakaryocyte polyploidization: role in platelet production. *Platelets*. 22 sept 2019;0(0):1-10.
75. Smith EC, Teixeira AM, Chen RC, Wang L, Gao Y, Hahn KL, et al. Induction of megakaryocyte differentiation drives nuclear accumulation and transcriptional function of MKL1 via actin polymerization and RhoA activation. *Blood*. 14 févr 2013;121(7):1094-101.
76. Gilles L, Bluteau D, Boukour S, Chang Y, Zhang Y, Robert T, et al. MAL/SRF complex is involved in platelet formation and megakaryocyte migration by regulating MYL9 (MLC2) and MMP9. *Blood*. 5 nov 2009;114(19):4221-32.
77. Raslova H, Kauffmann A, Sekkaï D, Ripoché H, Larbret F, Robert T, et al. Interrelation between polyploidization and megakaryocyte differentiation: a gene profiling approach. *Blood*. 15 avr 2007;109(8):3225-34.
78. Shin J-W, Swift J, Spinler KR, Discher DE. Myosin-II inhibition and soft 2D matrix maximize multinucleation and cellular projections typical of platelet-producing megakaryocytes. *Proc Natl Acad Sci*. 12 juill 2011;108(28):11458-63.
79. Sun S, Zimmet JM, Toselli P, Thompson A, Jackson CW, Ravid K. Overexpression of cyclin D1 moderately increases ploidy in megakaryocytes. *Haematologica*. janv 2001;86(1):17-23.



80. Wang Z, Zhang Y, Kamen D, Lees E, Ravid K. Cyclin D3 is essential for megakaryocytopoiesis. *Blood*. 15 nov 1995;86(10):3783-8.
81. Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhattacharya S, et al. Cyclin E ablation in the mouse. *Cell*. 22 août 2003;114(4):431-43.
82. Cyclin D3 and megakaryocyte development: Exploration of a transgenic phenotype - Zimmet - 1998 - STEM CELLS - Wiley Online Library [Internet]. [cité 16 juin 2020]. Disponible sur: <https://stemcellsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/stem.5530160713>
83. Eliades A, Papadantonakis N, Ravid K. New Roles for Cyclin E in Megakaryocytic Polyploidization. *J Biol Chem*. 6 nov 2010;285(24):18909-17.
84. Baccini V, Roy L, Vitrat N, Chagraoui H, Sabri S, Le Couedic JP, et al. Role of p21(Cip1/Waf1) in cell-cycle exit of endomitotic megakaryocytes. *Blood*. 1 déc 2001;98(12):3274-82.
85. Roy L, Coullin P, Vitrat N, Hellio R, Debili N, Weinstein J, et al. Asymmetrical segregation of chromosomes with a normal metaphase/anaphase checkpoint in polyploid megakaryocytes. *Blood*. 15 avr 2001;97(8):2238-47.
86. Seki A, Coppinger JA, Jang C-Y, Yates JR, Fang G. Bora and the Kinase Aurora A Cooperatively Activate the Kinase Plk1 and Control Mitotic Entry. *Science*. 20 juin 2008;320(5883):1655-8.
87. Macûrek L, Lindqvist A, Lim D, Lampson MA, Klompaker R, Freire R, et al. Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature*. sept 2008;455(7209):119-23.
88. Trakala M, Partida D, Salazar-Roa M, Maroto M, Wachowicz P, de Cárcer G, et al. Activation of the endomitotic spindle assembly checkpoint and thrombocytopenia in Plk1-deficient mice. *Blood*. 1 oct 2015;126(14):1707-14.
89. Eckerdt F, Maller JL. Kicking off the polo game. *Trends Biochem Sci*. 1 nov 2008;33(11):511-3.
90. Debili N, Coulombel L, Croisille L, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, et al. Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood*. 15 août 1996;88(4):1284-96.
91. Debili N, Issaad C, Masse JM, Guichard J, Katz A, Breton-Gorius J, et al. Expression of CD34 and platelet glycoproteins during human megakaryocytic differentiation. *Blood*. 15 déc 1992;80(12):3022-35.



92. Briddell RA, Brandt JE, Straneva JE, Srour EF, Hoffman R. Characterization of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood*. 1 juill 1989;74(1):145-51.
93. Kirshenbaum AS, Akin C, Goff JP, Metcalfe DD. Thrombopoietin alone or in the presence of stem cell factor supports the growth of KIT(CD117)low/MPL(CD110)+ human mast cells from hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. avr 2005;33(4):413-21.
94. Tomer A. Human marrow megakaryocyte differentiation: multiparameter correlative analysis identifies von Willebrand factor as a sensitive and distinctive marker for early (2N and 4N) megakaryocytes. *Blood*. 1 nov 2004;104(9):2722-7.
95. Bastian LS, Yagi M, Chan C, Roth GJ. Analysis of the Megakaryocyte Glycoprotein IX Promoter Identifies Positive and Negative Regulatory Domains and Functional GATA and Ets Sites. *J Biol Chem*. 2 août 1996;271(31):18554-60.
96. Imamura N, Ota H, Abe K, Kuramoto A. Expression of the thrombospondin receptor (CD36) on the cell surface in megakaryoblastic and promegakaryocytic leukemias: increment of the receptor by megakaryocyte differentiation in vitro. *Am J Hematol*. févr 1994;45(2):181-4.
97. Berger G, Caen JP, Berndt MC, Cramer EM. Ultrastructural demonstration of CD36 in the alpha-granule membrane of human platelets and megakaryocytes. *Blood*. 15 nov 1993;82(10):3034-44.
98. Øvrebø JI, Edgar BA. Polyploidy in tissue homeostasis and regeneration. *Development* [Internet]. 15 juill 2018 [cité 15 avr 2021];145(14). Disponible sur: <https://dev.biologists.org/content/145/14/dev156034>
99. Sébahoun G. Hématologie clinique et biologique. Arnette; 2005. 600 p.
100. Sola-Visner M, Ramsey H. Developmental Megakaryocytopoiesis. In: *Fetal and Neonatal Physiology* [Internet]. Elsevier; 2017 [cité 15 févr 2021]. p. 1135-1150.e4. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323352147001177>
101. Scandola C, Erhardt M, Rinckel J-Y, Proamer F, Gachet C, Eckly A. Use of electron microscopy to study megakaryocytes. *Platelets*. 3 juill 2020;31(5):589-98.
102. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers [Internet]. [cité 15 févr 2021]. Disponible sur: <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-l-hematologiecellulaire/plaquettes-sanguines-et-leur-pathologie/24-physiologie-de-lamegakaryopoiese>
103. Budak YU, Polat M, Huysal K. The use of platelet indices, plateletcrit, mean platelet volume and platelet distribution width in emergency non-traumatic abdominal surgery: a systematic review. *Biochem Medica*. 10 juin 2016;26(2):178-93.



104. van der Meijden PEJ, Heemskerk JWM. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol.* mars 2019;16(3):166-79.
105. Li C, Li J, Ni H. Crosstalk Between Platelets and Microbial Pathogens. *Front Immunol.* 2020;11:1962.
106. Marín Oyarzún CP, Glembotsky AC, Goette NP, Lev PR, De Luca G, Baroni Pietto MC, et al. Platelet Toll-Like Receptors Mediate Thromboinflammatory Responses in Patients With Essential Thrombocythemia. *Front Immunol.* 2020;11:705.
107. Broadley SP, Plaumann A, Coletti R, Lehmann C, Wanisch A, Seidlmeier A, et al. Dual-Track Clearance of Circulating Bacteria Balances Rapid Restoration of Blood Sterility with Induction of Adaptive Immunity. *Cell Host Microbe.* 13 juill 2016;20(1):36-48.
108. Yamada E. The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat (Basel).* 1957;29(3):267-90.
109. Tavassoli M. Fusion-fission reorganization of membrane: a developing membrane model for thrombocytopoiesis in megakaryocytes. *Blood Cells.* 23 mars 1979;5(1):89-99.
110. MacPHERSON GG. Synthesis and Localization of Sulphated Mucopolysaccharide in Megakaryocytes and Platelets of the Rat, An Analysis by Electron-Microscope Autoradiography. *J Cell Sci.* 1 mai 1972;10(3):705-17.
111. WRIGHT JH. The Origin and Nature of the Blood Plates. *Boston Med Surg J.* 7 juin 1906;154(23):643-5.
112. Thiery JP, Bessis M. [Mechanism of platelet genesis; in vitro study by cinemicrophotography]. *Rev Hematol.* mai 1956;11(2):162-74.
113. Lewis JC, Maldonado JE, Mann KG, Moertel CG. Ultrastructural cytochemistry of platelets and megakaryocytes in the carcinoid syndrome. *Mayo Clin Proc.* sept 1976;51(9):585-93.
114. Becker RP, Bruyn PPHD. The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am J Anat.* 1976;145(2):183-205.
115. Leven RM, Yee MK. Megakaryocyte morphogenesis stimulated in vitro by whole and partially fractionated thrombocytopenic plasma: a model system for the study of platelet formation. *Blood.* avr 1987;69(4):1046-52.



116. Radley JM, Haller CJ. The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood*. juill 1982;60(1):213-9.
117. Italiano JE, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood Platelets Are Assembled Principally at the Ends of Proplatelet Processes Produced by Differentiated Megakaryocytes. *J Cell Biol*. 13 déc 1999;147(6):1299-312.
118. Machlus KR, Italiano JE. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol*. 10 juin 2013;201(6):785-96.
119. Richardson JL, Shivdasani RA, Boers C, Hartwig JH, Italiano JE. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood*. 15 déc 2005;106(13):4066-75.
120. Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*. 21 sept 2007;317(5845):1767-70.
121. Thon JN, Macleod H, Begonja AJ, Zhu J, Lee K-C, Mogilner A, et al. Microtubule and cortical forces determine platelet size during vascular platelet production. *Nat Commun*. 22 mai 2012;3(1):852.
122. Lefrançais E, Looney MR. Platelet Biogenesis in the Lung Circulation. *Physiol Bethesda Md*. 1 nov 2019;34(6):392-401.
123. Platelet Morphology, Biochemistry, and Function | Williams Hematology Hemostasis and Thrombosis | AccessHemOnc | McGraw-Hill Medical [Internet]. [cité 16 févr 2021]. Disponible sur: <https://hemonc.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2272§ionid=175059886>
124. Reddi AH, Gay R, Gay S, Miller EJ. Transitions in collagen types during matrix-induced cartilage, bone, and bone marrow formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. déc 1977;74(12):5589-92.
125. Takahashi R, Sekine N, Nakatake T. Influence of monoclonal antiplatelet glycoprotein antibodies on in vitro human megakaryocyte colony formation and proplatelet formation. *Blood*. 15 mars 1999;93(6):1951-8.
126. Geddis AE. Megakaryopoiesis. *Semin Hematol*. juill 2010;47(3):212-9.
127. Yang J, Zhao S, Ma D. Biological Characteristics and Regulation of Early Megakaryocytopoiesis. *Stem Cell Rev Rep*. 1 oct 2019;15(5):652-63.
128. Lazzari L, Henschler R, Lecchi L, Rebulla P, Mertelsmann R, Sirchia G. Interleukin-6 and interleukin-11 act synergistically with thrombopoietin and stem cell fac-



tor to modulate ex vivo expansion of human CD41+ and CD61+ megakaryocytic cells. *Haematologica*. janv 2000;85(1):25-30.

129. Erickson-Miller CL, Ji H, Murphy MJ. Megakaryocytopoiesis and platelet production: does stem cell factor play a role? *Stem Cells Dayt Ohio*. juill 1993;11 Suppl 2:163-9.
130. Sandrock B, Hudson KM, Williams DE, Lieberman MA. Cytokine production by a megakaryocytic cell line. *Vitro Cell Dev Biol - Anim*. avr 1996;32(4):225-33.
131. Oudenriijn SVD, Haas MD, Calafat J, Schoot CEVD, Borne AEGKVD. A combination of megakaryocyte growth and development factor and interleukin-1 is sufficient to culture large numbers of megakaryocytic progenitors and megakaryocytes for transfusion purposes. *Br J Haematol*. 1999;106(2):553-63.
132. Laluppa JA, Papoutsakis ET, Miller WM. Evaluation of cytokines for expansion of the megakaryocyte and granulocyte lineages. *Stem Cells Dayt Ohio*. 1997;15(3):198-206.
133. Akin C, Sonnenfeld G. Stimulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) production and its role as an autocrine inducer of CD14 upregulation in human myeloid leukemia cells. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res*. juin 1996;16(6):479-86.
134. Chen YZ, Gu XF, Caen JP, Han ZC. Interleukin-3 is an autocrine growth factor of human megakaryoblasts, the DAMI and MEG-01 cells. *Br J Haematol*. nov 1994;88(3):481-7.
135. Kobayashi S, Teramura M, Sugawara I, Oshimi K, Mizoguchi H. Interleukin-11 Acts as an Autocrine Growth Factor for Human Megakaryoblastic Cell Lines. *Blood*. 15 févr 1993;81(4):889-93.
136. McNiece IK, Briddell RA. Stem cell factor. *J Leukoc Biol*. juill 1995;58(1):14-22.
137. Gainsford T, Nandurkar H, Metcalf D, Robb L, Begley CG, Alexander WS. The residual megakaryocyte and platelet production in c-mpl-deficient mice is not dependent on the actions of interleukin-6, interleukin-11, or leukemia inhibitory factor. *Blood*. 15 janv 2000;95(2):528-34.
138. de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature*. 16 juin 1994;369(6481):533-8.
139. Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell*. 1 juill 1994;77(7):1117-24.



140. Foster DC, Sprecher CA, Grant FJ, Kramer JM, Kuijper JL, Holly RD, et al. Human thrombopoietin: gene structure, cDNA sequence, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20 déc 1994;91(26):13023-7.
141. Noetzli LJ, French SL, Machlus KR. New Insights Into the Differentiation of Megakaryocytes From Hematopoietic Progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. juill 2019;39(7):1288-300.
142. Murone M, Carpenter DA, de Sauvage FJ. Hematopoietic deficiencies in c-mpl and TPO knockout mice. *Stem Cells Dayt Ohio*. 1998;16(1):1-6.
143. Broudy VC, Lin NL, Kaushansky K. Thrombopoietin (c-mpl Ligand) Acts Synergistically With Erythropoietin, Stem Cell Factor, and Interleukin-11 to Enhance Murine Megakaryocyte Colony Growth and Increases Megakaryocyte Ploidy In Vitro. *Blood*. 1 avr 1995;85(7):1719-26.
144. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest*. 1 déc 2005;115(12):3339-47.
145. Zheng C, Yang R, Han Z, Zhou B, Liang L, Lu M. TPO-independent megakaryocytopoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. mars 2008;65(3):212-22.
146. Malara A, Balduini A. Blood platelet production and morphology. *Thromb Res*. mars 2012;129(3):241-4.
147. Nagata Y, Nagahisa H, Aida Y, Okutomi K, Nagasawa T, Todokoro K. Thrombopoietin Induces Megakaryocyte Differentiation in Hematopoietic Progenitor FDC-P2 Cells (*). *J Biol Chem*. 25 août 1995;270(34):19673-5.
148. Ohashi H, Morita H, Tahara T, Tsunakawa H, Matsumoto A, Ogami K, et al. Thrombopoietin stimulates proliferation and megakaryocytic differentiation of mouse pro-B cell line BF-TE22. *Cytotechnology*. 1 mai 1998;26(3):199-206.
149. Vigon I, Mornon JP, Cocault L, Mitjavila MT, Tambourin P, Gisselbrecht S, et al. Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 juin 1992;89(12):5640-4.
150. Ninos JM, Jefferies LC, Cogle CR, Kerr WG. The thrombopoietin receptor, c-Mpl, is a selective surface marker for human hematopoietic stem cells. *J Transl Med*. 16 févr 2006;4:9.
151. Ng AP, Kauppi M, Metcalf D, Hyland CD, Josefsson EC, Lebois M, et al. Mpl expression on megakaryocytes and platelets is dispensable for thrombopoiesis but essential to prevent myeloproliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 avr 2014;111(16):5884-9.



152. Geddis AE, Fox NE, Kaushansky K. The Mpl receptor expressed on endothelial cells does not contribute significantly to the regulation of circulating thrombopoietin levels. *Exp Hematol.* janv 2006;34(1):82-6.
153. Kaushansky K, Drachman JG. The molecular and cellular biology of thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Oncogene.* mai 2002;21(21):3359-67.
154. Miyakawa Y, Rojnuckarin P, Habib T, Kaushansky K. Thrombopoietin Induces Phosphoinositol 3-Kinase Activation through SHP2, Gab, and Insulin Receptor Substrate Proteins in BAF3 Cells and Primary Murine Megakaryocytes *. *J Biol Chem.* 26 janv 2001;276(4):2494-502.
155. Bouscary D, Lecoq-Lafon C, Chrétien S, Zompi S, Fichelson S, Muller O, et al. Role of Gab proteins in phosphatidylinositol 3-kinase activation by thrombopoietin (Tpo). *Oncogene.* avr 2001;20(18):2197-204.
156. Kirito K, Fox N, Kaushansky K. Thrombopoietin stimulates Hoxb4 expression: an explanation for the favorable effects of TPO on hematopoietic stem cells. *Blood.* 1 nov 2003;102(9):3172-8.
157. Drachman JG, Sabath DF, Fox NE, Kaushansky K. Thrombopoietin signal transduction in purified murine megakaryocytes. *Blood.* 15 janv 1997;89(2):483-92.
158. Rojnuckarin P, Miyakawa Y, Fox N, Deou J, Daum G, Kaushansky K. The roles of PI3K and PKC ζ for thrombopoietin-induced MAP kinase activation in primary murine megakaryocytes. *J Biol Chem.* 1 déc 2001;276:41014-22.
159. Rojnuckarin P, Drachman JG, Kaushansky K. Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis. *Blood.* 15 août 1999;94(4):1273-82.
160. van Willigen G, Gorter G, Akkerman JW. Thrombopoietin increases platelet sensitivity to alpha-thrombin via activation of the ERK2-cPLA2 pathway. *Thromb Haemost.* avr 2000;83(4):610-6.
161. Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi B-I, Nagasawa T. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity.* juin 2004;20(6):707-18.
162. Ara T, Tokoyoda K, Sugiyama T, Egawa T, Kawabata K, Nagasawa T. Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity.* août 2003;19(2):257-67.
163. Nagasawa T, Omatsu Y, Sugiyama T. Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends Immunol.* juill 2011;32(7):315-20.



164. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. déc 2006;25(6):977-88.
165. Secchiero P, Celeghini C, Cutroneo G, Baldassarre AD, Rana R, Zauli G. Differential effects of stromal derived factor-1 α (SDF-1 α) on early and late stages of human megakaryocytic development. *Anat Rec*. 2000;260(2):141-7.
166. Hamada T, Möhle R, Hesselgesser J, Hoxie J, Nachman RL, Moore MAS, et al. Transendothelial Migration of Megakaryocytes in Response to Stromal Cell-derived Factor 1 (SDF-1) Enhances Platelet Formation. *J Exp Med*. 3 août 1998;188(3):539-48.
167. Fox NE, Kaushansky K. Engagement of integrin $\alpha 4 \beta 1$ enhances thrombopoietin-induced megakaryopoiesis. *Exp Hematol*. janv 2005;33(1):94-9.
168. Wang JF, Liu ZY, Groopman JE. The alpha-chemokine receptor CXCR4 is expressed on the megakaryocytic lineage from progenitor to platelets and modulates migration and adhesion. *Blood*. 1 août 1998;92(3):756-64.
169. Guerriero R, Parolini I, Testa U, Samoggia P, Petrucci E, Sargiacomo M, et al. Inhibition of TPO-induced MEK or mTOR activity induces opposite effects on the ploidy of human differentiating megakaryocytes. *J Cell Sci*. 15 févr 2006;119(4):744-52.
170. Lane WJ, Dias S, Hattori K, Heissig B, Choy M, Rabbany SY, et al. Stromal-derived factor 1-induced megakaryocyte migration and platelet production is dependent on matrix metalloproteinases. *Blood*. 15 déc 2000;96(13):4152-9.
171. Majka M, Ratajczak J, Kowalska MA, Ratajczak MZ. Binding of stromal derived factor-1 α (SDF-1 α) to CXCR4 chemokine receptor in normal human megakaryoblasts but not in platelets induces phosphorylation of mitogen-activated protein kinase p42/44 (MAPK), ELK-1 transcription factor and serine/threonine kinase AKT. *Eur J Haematol*. mars 2000;64(3):164-72.
172. Rabellino EM, Levene RB, Leung LL, Nachman RL. Human megakaryocytes. II. Expression of platelet proteins in early marrow megakaryocytes. *J Exp Med*. 1 juill 1981;154(1):88-100.
173. Jong EK de, Haas AH de, Brouwer N, Weering HRJ van, Hensens M, Bechmann I, et al. Expression of CXCL4 in microglia in vitro and in vivo and its possible signaling through CXCR3. *J Neurochem*. juin 2008;105(5):1726-36.
174. Rauova L, Zhai L, Kowalska MA, Arepally GM, Cines DB, Poncz M. Role of platelet surface PF4 antigenic complexes in heparin-induced thrombocytopenia pathogenesis: diagnostic and therapeutic implications. *Blood*. 15 mars 2006;107(6):2346-53.



175. Kowalska MA, Rauova L, Poncz M. Role of the platelet chemokine platelet factor 4 (PF4) in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res.* avr 2010;125(4):292-6.
176. Dudek AZ, Nesmelova I, Mayo K, Verfaillie CM, Pitchford S, Slungaard A. Platelet factor 4 promotes adhesion of hematopoietic progenitor cells and binds IL-8: novel mechanisms for modulation of hematopoiesis. *Blood.* 15 juin 2003;101(12):4687-94.
177. Mayo KH, Chen MJ. Human platelet factor 4 monomer-dimer-tetramer equilibria investigated by proton NMR spectroscopy. *Biochemistry.* 1 nov 1989;28(24):9469-78.
178. Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of the CXC chemokines platelet factor-4 (CXCL4/PF-4) and its variant (CXCL4L1/PF-4var) in inflammation, angiogenesis and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1 févr 2011;22(1):1-18.
179. Lambert MP, Rauova L, Bailey M, Sola-Visner MC, Kowalska MA, Poncz M. Platelet factor 4 is a negative autocrine in vivo regulator of megakaryopoiesis: clinical and therapeutic implications. *Blood.* 15 août 2007;110(4):1153-60.
180. Han ZC, Sensébe L, Abgrall JF, Brière J. Platelet factor 4 inhibits human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood.* 15 mars 1990;75(6):1234-9.
181. Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 Function, a Paradigm for Transcription Factors in Hematopoiesis. *Mol Cell Biol.* févr 2005;25(4):1215-27.
182. Mancini E, Sanjuan-Pla A, Luciani L, Moore S, Grover A, Zay A, et al. FOG-1 and GATA-1 act sequentially to specify definitive megakaryocytic and erythroid progenitors. *EMBO J.* 18 janv 2012;31(2):351-65.
183. Shivdasani RA, Fujiwara Y, McDevitt MA, Orkin SH. A lineage-selective knock-out establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J.* 1 juill 1997;16(13):3965-73.
184. Vyas P, Ault K, Jackson CW, Orkin SH, Shivdasani RA. Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood.* 1 mai 1999;93(9):2867-75.
185. Muntean AG, Ge Y, Taub JW, Crispino JD. Transcription factor GATA-1 and Down syndrome leukemogenesis. *Leuk Lymphoma.* juin 2006;47(6):986-97.
186. Gao Z, Huang Z, Olivey HE, Gurbuxani S, Crispino JD, Svensson EC. FOG-1-mediated recruitment of NuRD is required for cell lineage re-enforcement during haematopoiesis. *EMBO J.* 20 janv 2010;29(2):457-68.



187. Mehaffey MG, Newton AL, Gandhi MJ, Crossley M, Drachman JG. X-linked thrombocytopenia caused by a novel mutation of GATA-1. *Blood*. 1 nov 2001;98(9):2681-8.
188. Yu C, Niakan KK, Matsushita M, Stamatoyannopoulos G, Orkin SH, Raskind WH. X-linked thrombocytopenia with thalassemia from a mutation in the amino finger of GATA-1 affecting DNA binding rather than FOG-1 interaction. *Blood*. 15 sept 2002;100(6):2040-5.
189. Ishikawa Y. Genetic abnormalities in core binding factor acute myeloid leukemia. *Rinsho Ketsueki*. 2017;58(8):991-8.
190. Bonifer C, Levantini E, Kouskoff V, Lacaud G. Runx1 Structure and Function in Blood Cell Development. *Adv Exp Med Biol*. 2017;962:65-81.
191. Nagai R, Matsuura E, Hoshika Y, Nakata E, Nagura H, Watanabe A, et al. RUNX1 suppression induces megakaryocytic differentiation of UT-7/GM cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 23 juin 2006;345(1):78-84.
192. Elagib KE, Racke FK, Mogass M, Khetawat R, Delehanty LL, Goldfarb AN. RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood*. 1 juin 2003;101(11):4333-41.
193. Goldfarb AN. Transcriptional control of megakaryocyte development. *Oncogene*. oct 2007;26(47):6795-802.
194. Wang C, Wang W, Huang L, Hayashi Y, Cai X, Yan X, et al. RUNX1 Mutation Leads to Megakaryocyte-Primed Hematopoietic Stem Cell Expansion and Familial Platelet Disorder. *Blood*. 5 nov 2020;136(Supplement 1):8-9.
195. Gowney JD, Shigematsu H, Li Z, Lee BH, Adelsperger J, Rowan R, et al. Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. *Blood*. 15 juill 2005;106(2):494-504.
196. Simon L, Spinella J-F, Yao C-Y, Lavallée V-P, Boivin I, Boucher G, et al. High frequency of germline RUNX1 mutations in patients with RUNX1-mutated AML. *Blood*. 21 mai 2020;135(21):1882-6.
197. Bluteau D, Glembotsky AC, Raimbault A, Balayn N, Gilles L, Rameau P, et al. Dysmegakaryopoiesis of FPD/AML pedigrees with constitutional RUNX1 mutations is linked to myosin II deregulated expression. *Blood*. 27 sept 2012;120(13):2708-18.
198. Lordier L, Jalil A, Aurade F, Larbret F, Larghero J, Debili N, et al. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood*. 15 oct 2008;112(8):3164-74.



199. Putz G, Rosner A, Nuesslein I, Schmitz N, Buchholz F. AML1 deletion in adult mice causes splenomegaly and lymphomas. *Oncogene*. 9 févr 2006;25(6):929-39.
200. Schlaeger TM, Mikkola HKA, Gekas C, Helgadottir HB, Orkin SH. Tie2Cre-mediated gene ablation defines the stem-cell leukemia gene (SCL/tal1)-dependent window during hematopoietic stem-cell development. *Blood*. 15 mai 2005;105(10):3871-4.
201. Hall MA, Curtis DJ, Metcalf D, Elefanty AG, Sourris K, Robb L, et al. The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4 févr 2003;100(3):992-7.
202. McCormack MP, Hall MA, Schoenwaelder SM, Zhao Q, Ellis S, Prentice JA, et al. A critical role for the transcription factor Scl in platelet production during stress thrombopoiesis. *Blood*. 1 oct 2006;108(7):2248-56.
203. Mikkola HKA, Klintman J, Yang H, Hock H, Schlaeger TM, Fujiwara Y, et al. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature*. 30 janv 2003;421(6922):547-51.
204. Kassouf MT, Chagraoui H, Vyas P, Porcher C. Differential use of SCL/TAL-1 DNA-binding domain in developmental hematopoiesis. *Blood*. 15 août 2008;112(4):1056-67.
205. Gekas C, Rhodes KE, Gereige LM, Helgadottir H, Ferrari R, Kurdistani SK, et al. Mef2C is a lineage-restricted target of Scl/Tal1 and regulates megakaryopoiesis and B-cell homeostasis. *Blood*. 9 avr 2009;113(15):3461-71.
206. Carpinelli MR, Hilton DJ, Metcalf D, Antonchuk JL, Hyland CD, Mifsud SL, et al. Suppressor screen in Mpl^{-/-} mice: c-Myb mutation causes supraphysiological production of platelets in the absence of thrombopoietin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 avr 2004;101(17):6553-8.
207. Sandberg ML, Sutton SE, Pletcher MT, Wiltshire T, Tarantino LM, Hogenesch JB, et al. c-Myb and p300 regulate hematopoietic stem cell proliferation and differentiation. *Dev Cell*. févr 2005;8(2):153-66.
208. Mukai HY, Motohashi H, Ohneda O, Suzuki N, Nagano M, Yamamoto M. Transgene insertion in proximity to the c-myb gene disrupts erythroid-megakaryocytic lineage bifurcation. *Mol Cell Biol*. nov 2006;26(21):7953-65.
209. Kaspar P, Zikova M, Bartunek P, Sterba J, Strnad H, Kren L, et al. The Expression of c-Myb Correlates with the Levels of Rhabdomyosarcoma-specific Marker Myogenin. *Sci Rep*. 14 oct 2015;5(1):15090.



210. Matsuoka H, Unami A, Fujimura T, Noto T, Takata Y, Yoshizawa K, et al. Mechanisms of HDAC inhibitor-induced thrombocytopenia. *Eur J Pharmacol.* 1 oct 2007;571(2-3):88-96.
211. Katsuoka F, Yamamoto M. Small Maf proteins (MafF, MafG, MafK): History, structure and function. *Gene.* 25 juill 2016;586(2):197-205.
212. Levin J, Peng J-P, Baker GR, Villeval J-L, Lecine P, Burstein SA, et al. Pathophysiology of Thrombocytopenia and Anemia in Mice Lacking Transcription Factor NF-E2. *Blood.* 1 sept 1999;94(9):3037-47.
213. Lecine P, Villeval JL, Vyas P, Swencki B, Xu Y, Shivdasani RA. Mice lacking transcription factor NF-E2 provide in vivo validation of the proplatelet model of thrombocytopoiesis and show a platelet production defect that is intrinsic to megakaryocytes. *Blood.* 1 sept 1998;92(5):1608-16.
214. Vo KK, Jarocha DJ, Lyde RB, Hayes V, Thom CS, Sullivan SK, et al. FLI1 level during megakaryopoiesis affects thrombopoiesis and platelet biology. *Blood.* 29 juin 2017;129(26):3486-94.
215. Li Y, Luo H, Liu T, Zacksenhaus E, Ben-David Y. The ets transcription factor Fli-1 in development, cancer and disease. *Oncogene.* 16 avr 2015;34(16):2022-31.
216. Moussa O, LaRue AC, Abangan RS, Williams CR, Zhang XK, Masuya M, et al. Thrombocytopenia in Mice Lacking the Carboxy-Terminal Regulatory Domain of the Ets Transcription Factor Fli1. *Mol Cell Biol.* 1 nov 2010;30(21):5194-206.
217. Hart A, Melet F, Grossfeld P, Chien K, Jones C, Tunnacliffe A, et al. Fli-1 Is Required for Murine Vascular and Megakaryocytic Development and Is Hemizygotously Deleted in Patients with Thrombocytopenia. *Immunity.* 1 août 2000;13(2):167-77.
218. Ma Z, Morris SW, Valentine V, Martin L, Herbrick J-A, Cui X, et al. Fusion of two novel genes, RBM15 and MKL1, in the t (1; 22)(p13; q13) of acute megakaryoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2001;28(3):220-1.
219. Miralles F, Posern G, Zaromytidou A-I, Treisman R. Actin Dynamics Control SRF Activity by Regulation of Its Coactivator MAL. *Cell.* 2 mai 2003;113(3):329-42.
220. Smith EC, Teixeira AM, Chen RC, Wang L, Gao Y, Hahn KL, et al. Induction of megakaryocyte differentiation drives nuclear accumulation and transcriptional function of MKL1 via actin polymerization and RhoA activation. *Blood.* 14 févr 2013;121(7):1094-101.
221. Cheng E, Luo Q, Bruscia EM, Renda MJ, Troy JA, Massaro SA, et al. Role for MKL1 in megakaryocytic maturation. *Blood.* 19 mars 2009;113(12):2826-34.



222. Takayama M, Fujita R, Suzuki M, Okuyama R, Aiba S, Motohashi H, et al. Genetic analysis of hierarchical regulation for Gata1 and NF-E2 p45 gene expression in megakaryopoiesis. *Mol Cell Biol.* juin 2010;30(11):2668-80.
223. Starck J, Cohet N, Gonnet C, Sarrazin S, Doubeikovskaia Z, Doubeikovski A, et al. Functional cross-antagonism between transcription factors FLI-1 and EKLF. *Mol Cell Biol.* févr 2003;23(4):1390-402.
224. Zang C, Luyten A, Chen J, Liu XS, Shivdasani RA. NF-E2, FLI1 and RUNX1 collaborate at areas of dynamic chromatin to activate transcription in mature mouse megakaryocytes. *Sci Rep.* 26 juill 2016;6:30255.
225. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* août 1972;26(4):239-57.
226. Erekat NS. Apoptosis and its Role in Parkinson's Disease. In: Stoker TB, Greenland JC, éditeurs. *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2018 [cité 26 févr 2021]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536724/>
227. Behl C. Apoptosis and Alzheimer's disease. *J Neural Transm Vienna Austria* 1996. 2000;107(11):1325-44.
228. Gougeon M-L. Apoptose et sida. *Rev Fr Lab.* 1 mars 1999;1999(311):57-63.
229. Brill A, Torchinsky A, Carp H, Toder V. The Role of Apoptosis in Normal and Abnormal Embryonic Development. *J Assist Reprod Genet.* nov 1999;16(10):512-9.
230. Weingärtner J, Lotz K, Faltermeier A, Driemel O, Kleinheinz J, Gedrange T, et al. The role of apoptosis in early embryonic development of the adenohypophysis in rats. *Head Face Med.* 23 juill 2008;4(1):13.
231. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* avr 2002;2(4):277-88.
232. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* juin 2019;43(6):582-92.
233. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jürgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, et al. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science.* 25 sept 1998;281(5385):2027-31.



234. Kuwana T et al. (2002), Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramol... - Paper [Internet]. [cité 1 mars 2021]. Disponible sur: <http://www.xenbase.org/literature/article.do?method=display&articleId=6240>
235. Sugiyama T, Shimizu S, Matsuoka Y, Yoneda Y, Tsujimoto Y. Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by pro-apoptotic BH3-only protein Bim. *Oncogene*. 25 juill 2002;21(32):4944-56.
236. (6) Waterhouse NJ, Goldstein JC, von Ahsen O, Schuler M, Newmeyer DD & Green DR. Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J Cell Biol* 153: 319–328 | Request PDF [Internet]. [cité 1 mars 2021]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/12026017_Waterhouse_NJ_Goldstein_JC_von_Ahsen_O_Schuler_M_Newmeyer_DD_Green_DR_Cytochrome_c_maintains_mitochondrial_transmembrane_potential_and_ATP_generation_after_outer_mitochondrial_membrane_permeabilization
237. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 12 juill 1996;86(1):147-57.
238. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 8 août 1997;90(3):405-13.
239. Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES, et al. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J*. 1 mars 2001;20(5):998-1009.
240. Adrain C, Slee A, Harte M, Martin SJ. Adrain C, Slee EA, Harte MT, Martin SJ. Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *J Biol Chem* 274: 20855-20860. *J Biol Chem*. 1 août 1999;274:20855-60.
241. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*. févr 2002;9(2):423-32.
242. Yang Q-H, Church-Hajduk R, Ren J, Newton ML, Du C. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev*. 15 juin 2003;17(12):1487-96.
243. Gao Z, Tian Y, Wang J, Yin Q, Wu H, Li Y-M, et al. A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo. *J Biol Chem*. 19 oct 2007;282(42):30718-27.



244. Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM. Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res.* 15 avr 1994;54(8):2095-7.
245. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 27 janv 1995;80(2):293-9.
246. Moll UM, Wolff S, Speidel D, Deppert W. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol.* déc 2005;17(6):631-6.
247. Erster S, Moll UM. Stress-induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochem Biophys Res Commun.* 10 juin 2005;331(3):843-50.
248. Dietrich JB. Apoptose et Gènes Anti-Apoptotiques de la Famille Bcl-2. *Arch Physiol Biochem.* janv 1997;105(2):125-35.
249. Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, Ardavanis A, Papageorgiou S, Scorilas A. The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. *Adv Hematol [Internet].* 2012 [cité 1 mars 2021];2012. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3173728/>
250. Khemtémourian L, Sani M-A, Bathany K, Gröbner G, Dufourc EJ. Synthesis and secondary structure in membranes of the Bcl-2 anti-apoptotic domain BH4. *J Pept Sci Off Publ Eur Pept Soc.* janv 2006;12(1):58-64.
251. Reed JC. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ.* août 2006;13(8):1378-86.
252. Petros AM, Medek A, Nettesheim DG, Kim DH, Yoon HS, Swift K, et al. Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci.* 13 mars 2001;98(6):3012-7.
253. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 23 févr 2001;104(4):487-501.
254. Kaufmann T, Strasser A, Jost PJ. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ.* janv 2012;19(1):42-50.
255. Gibson SB, Oyer R, Spalding AC, Anderson SM, Johnson GL. Increased Expression of Death Receptors 4 and 5 Synergizes the Apoptosis Response to Combined Treatment with Etoposide and TRAIL. *Mol Cell Biol.* janv 2000;20(1):205-12.
256. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, et al. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem.* 19 déc 1997;272(51):32401-10.



257. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 28 août 1998;281(5381):1305-8.
258. Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol*. oct 1998;10(5):545-51.
259. Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*. 19 avr 2001;20(17):2122-33.
260. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. 14 juin 1996;85(6):803-15.
261. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*. 31 mai 2002;296(5573):1635-6.
262. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*. 19 mai 1995;81(4):495-504.
263. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 15 nov 1995;14(22):5579-88.
264. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, et al. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem*. 7 déc 2001;276(49):46639-46.
265. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. 19 mai 1995;81(4):505-12.
266. Yang X-D, Sun S-C. Targeting signaling factors for degradation, an emerging mechanism for TRAF functions. *Immunol Rev*. juill 2015;266(1):56-71.
267. Negroni A, Cucchiara S, Stronati L. Apoptosis, Necrosis, and Necroptosis in the Gut and Intestinal Homeostasis. *Mediators Inflamm*. 21 sept 2015;2015.
268. Wertz IE, Dixit VM. Ubiquitin-mediated regulation of TNFR1 signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1 juin 2008;19(3):313-24.
269. Eckhart L, Ballaun C, Hermann M, VandeBerg JL, Sipos W, Uthman A, et al. Identification of Novel Mammalian Caspases Reveals an Important Role of Gene Loss in Shaping the Human Caspase Repertoire. *Mol Biol Evol*. 1 mai 2008;25(5):831-41.



270. Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*. 28 mars 1986;44(6):817-29.
271. Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Berghe TV, Vandenabeele P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ*. janv 2007;14(1):44-55.
272. Sehra S, Dent AL. Caspase function and the immune system. *Crit Rev Immunol*. 2006;26(2):133-48.
273. Galliot B. Entre homéostasie et développement, quelles stratégies pour régénérer ? *Biol Aujourd'hui*. 2011;205(2):125-37.
274. D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ*. juill 2010;17(7):1104-14.
275. Jäger R, Zwacka RM. The Enigmatic Roles of Caspases in Tumor Development. *Cancers*. 24 nov 2010;2(4):1952-79.
276. Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*. janv 2007;14(1):32-43.
277. Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis Int J Program Cell Death*. août 2002;7(4):313-9.
278. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*. 9 mars 2001;276(10):7320-6.
279. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*. avr 2015;22(4):526-39.
280. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. nov 2004;5(11):897-907.
281. Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*. 1 déc 2004;384(Pt 2):201-32.
282. Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, et al. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*. 28 juill 1994;370(6487):270-5.
283. Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferenz CR, et al. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell*. 29 juill 1994;78(2):343-52.



284. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, et al. A Combinatorial Approach Defines Specificities of Members of the Caspase Family and Granzyme B: FUNCTIONAL RELATIONSHIPS ESTABLISHED FOR KEY MEDIATORS OF APOPTOSIS*. J Biol Chem. 18 juill 1997;272(29):17907-11.
285. Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, et al. A Unified Model for Apical Caspase Activation. Mol Cell. 1 févr 2003;11(2):529-41.
286. Shi Y. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. Mol Cell. 1 mars 2002;9(3):459-70.
287. Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. Curr Biol CB. 10 sept 1998;8(18):1001-8.
288. Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannilkulchai N, Beckmann JS, Mett IL, et al. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. Immunity. août 1998;9(2):267-76.
289. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. EMBO J. 16 mars 1998;17(6):1675-87.
290. Wolf BB, Schuler M, Echeverri F, Green DR. Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. J Biol Chem. 22 oct 1999;274(43):30651-6.
291. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. Science. 10 oct 1997;278(5336):294-8.
292. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. Oncogene. oct 2008;27(48):6194-206.
293. Li H, Zhu H, Xu C, Yuan J. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. Cell. 21 août 1998;94(4):491-501.
294. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. Cell Death Differ. déc 2000;7(12):1166-73.
295. McArthur K, Chappaz S, Kile BT. Apoptosis in megakaryocytes and platelets: the life and death of a lineage. Blood. 8 févr 2018;131(6):605-10.



296. Bhatlekar S, Basak I, Edelstein LC, Campbell RA, Lindsey CR, Italiano JE, et al. Anti-apoptotic BCL2L2 increases megakaryocyte proplatelet formation in cultures of human cord blood. *Haematologica*. 1 oct 2019;104(10):2075-83.
297. Josefsson EC, James C, Henley KJ, Debrincat MA, Rogers KL, Dowling MR, et al. Megakaryocytes possess a functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to survive and produce platelets. *J Exp Med*. 12 sept 2011;208(10):2017-31.
298. Terui Y, Furukawa Y, Kikuchi J, Iwase S, Hatake K, Miura Y. Bcl-x is a regulatory factor of apoptosis and differentiation in megakaryocytic lineage cells. *Exp Hematol*. mars 1998;26(3):236-44.
299. Sanz C, Benet I, Richard C, Badia B, Andreu EJ, Prosper F, et al. Antiapoptotic protein Bcl-x(L) is up-regulated during megakaryocytic differentiation of CD34(+) progenitors but is absent from senescent megakaryocytes. *Exp Hematol*. juin 2001;29(6):728-35.
300. Kaluzhny Y, Yu G, Sun S, Toselli PA, Nieswandt B, Jackson CW, et al. BclxL overexpression in megakaryocytes leads to impaired platelet fragmentation. *Blood*. 1 sept 2002;100(5):1670-8.
301. Josefsson EC, Burnett DL, Lebois M, Debrincat MA, White MJ, Henley KJ, et al. Platelet production proceeds independently of the intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. *Nat Commun*. 17 mars 2014;5:3455.
302. Apostolidis PA, Lindsey S, Miller WM, Papoutsakis ET. Proposed megakaryocytic regulon of p53: the genes engaged to control cell cycle and apoptosis during megakaryocytic differentiation. *Physiol Genomics*. 15 juin 2012;44(12):638-50.
303. Fuhrken PG, Apostolidis PA, Lindsey S, Miller WM, Papoutsakis ET. Tumor suppressor protein p53 regulates megakaryocytic polyploidization and apoptosis. *J Biol Chem*. 6 juin 2008;283(23):15589-600.
304. De Botton S, Sabri S, Daugas E, Zermati Y, Guidotti JE, Hermine O, et al. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*. 15 août 2002;100(4):1310-7.
305. Bonneau B. Implication of Bcl-2 family proteins in calcium fluxes regulation during early zebrafish development. 17 oct 2013;
306. Couzinet A, Hérincs Z, Hueber A-O. Régulation de la mort cellulaire programmée : vers une conception plus dynamique. *médecine/sciences*. 1 août 2002;18(8-9):841-52.
307. Badadani M. Autophagy Mechanism, Regulation, Functions, and Disorders. *ISRN Cell Biol*. 6 sept 2012;2012.



308. He L, Zhang J, Zhao J, Ma N, Kim SW, Qiao S, et al. Autophagy: The Last Defense against Cellular Nutritional Stress. *Adv Nutr Bethesda Md.* 1 juill 2018;9(4):493-504.
309. Palumbo S, Comincini S. Autophagy and ionizing radiation in tumors: the « survive or not survive » dilemma. *J Cell Physiol.* janv 2013;228(1):1-8.
310. Mazure NM, Pouyssegur J. Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Curr Opin Cell Biol.* 1 avr 2010;22(2):177-80.
311. Altman BJ, Rathmell JC. Metabolic Stress in Autophagy and Cell Death Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 9 janv 2012;4(9):a008763.
312. Colombo MI. Pathogens and autophagy: subverting to survive. *Cell Death Differ.* 1 nov 2005;12(2):1481-3.
313. Ktistakis NT. In praise of M. Anselmier who first used the term “autophagie” in 1859. *Autophagy.* 21 sept 2017;13(12):2015-7.
314. Harnett MM, Pineda MA, Latré de Laté P, Eason RJ, Besteiro S, Harnett W, et al. From Christian de Duve to Yoshinori Ohsumi: More to autophagy than just dining at home. *Biomed J.* févr 2017;40(1):9-22.
315. Deter R, Baudhuin P, Duve C. Deter RL, Baudhuin P, De Duve C.. Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *J Cell Biol* 35: C11-C16. *J Cell Biol.* 1 déc 1967;35:C11-6.
316. Hornyak T. Profile: Yoshinori Ohsumi: The rise and rise of a biology superstar. *Nature.* mars 2017;543(7646):S19-S19.
317. Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 25 oct 1993;333(1-2):169-74.
318. Li W, Li J, Bao J. Microautophagy: Lesser-Known self-eating. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 9 sept 2012;69:1125-36.
319. Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* juin 2018;19(6):365-81.
320. Fujiwara Y, Furuta A, Kikuchi H, Aizawa S, Hatanaka Y, Konya C, et al. Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy.* 1 mars 2013;9(3):403-9.
321. Fujiwara Y, Kikuchi H, Aizawa S, Furuta A, Hatanaka Y, Konya C, et al. Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes. *Autophagy.* août 2013;9(8):1167-71.



322. De Duve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol.* 1966;28:435-92.
323. Oku M, Sakai Y. Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries. *BioEssays.* 2018;40(6):1800008.
324. Krick R, Mühe Y, Prick T, Bredschneider M, Bremer S, Wenzel D, et al. Piece-meal microautophagy of the nucleus: Genetic and morphological traits. *Autophagy.* 1 mars 2009;5:270-2.
325. Lemasters JJ. Variants of mitochondrial autophagy: Types 1 and 2 mitophagy and micromitophagy (Type 3). *Redox Biol.* 1 janv 2014;2:749-54.
326. Kissová I, Salin B, Schaeffer J, Bhatia S, Manon S, Camougrand N. Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast. *Autophagy.* août 2007;3(4):329-36.
327. Wu H, Chen S, Ammar A-B, Xu J, Wu Q, Pan K, et al. Crosstalk Between Macroautophagy and Chaperone-Mediated Autophagy: Implications for the Treatment of Neurological Diseases. *Mol Neurobiol.* 2015;52(3):1284-96.
328. Cuervo AM, Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.* janv 2014;24(1):92-104.
329. Dice JF. Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy.* août 2007;3(4):295-9.
330. Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res.* juill 2010;20(7):748-62.
331. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, et al. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol.* mai 2009;29(10):2570-81.
332. Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol.* sept 2010;12(9):823-30.
333. Klionsky DJ. Look people, “Atg” is an abbreviation for “autophagy-related.” That’s it. *Autophagy.* 1 sept 2012;8(9):1281-2.
334. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell.* oct 2003;5(4):539-45.
335. Dunn WA. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.* avr 1994;4(4):139-43.



336. Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.* 1 nov 2001;20(21):5971-81.
337. Kim J, Huang W-P, Stromhaug PE, Klionsky DJ. Convergence of Multiple Autophagy and Cytoplasm to Vacuole Targeting Components to a Perivacuolar Membrane Compartment Prior to de Novo Vesicle Formation. *J Biol Chem.* 4 janv 2002;277(1):763-73.
338. Harding: Isolation and characterization of yeast... - Google Scholar [Internet]. [cité 2 mars 2021]. Disponible sur: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Isolation%20and%20characterization%20of%20yeast%20mutants%20in%20the%20cytoplasm%20to%20vacuole%20protein%20targeting%20pathway&publication_year=1995&author=T.M.%20Harding&author=K.A.%20Morano&author=S.V.%20Scott&author=D.J.%20Klionsky
339. Yip CK, Murata K, Walz T, Sabatini DM, Kang SA. Structure of the human mTOR Complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Mol Cell.* 11 juin 2010;38(5):768-74.
340. Caron A, Briscoe DM, Richard D, Laplante M. DEPTOR at the Nexus of Cancer, Metabolism, and Immunity. *Physiol Rev.* 1 juill 2018;98(3):1765-803.
341. Zachari M, Ganley IG. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem.* 12 déc 2017;61(6):585-96.
342. Abrahamsen H, Stenmark H, Platta H. Ubiquitination and phosphorylation of Beclin 1 and its binding partners: Tuning class III phosphatidylinositol 3-kinase activity and tumor suppression. *FEBS Lett.* 4 juin 2012;586:1584-91.
343. Jean S, Kiger AA. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *J Cell Sci.* 1 mars 2014;127(5):923-8.
344. Hurley JH, Young LN. Mechanisms of Autophagy Initiation. *Annu Rev Biochem.* 20 juin 2017;86:225-44.
345. Ravikumar B, Futter M, Jahreiss L, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, et al. Mammalian macroautophagy at a glance. *J Cell Sci.* 1 juin 2009;122(11):1707-11.
346. Noda NN, Inagaki F. Chapter 3 - Architecture of the Atg12–Atg5–Atg16 Complex and its Molecular Role in Autophagy. In: Hayat MA, éditeur. *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging* [Internet]. Amsterdam: Academic Press; 2014 [cité 2 mars 2021]. p. 57-65. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124055292000032>



347. Romanov J, Walczak M, Ibiricu I, Schüchner S, Ogris E, Kraft C, et al. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5–Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *EMBO J.* 14 nov 2012;31(22):4304-17.
348. Matsushita M, Suzuki NN, Obara K, Fujioka Y, Ohsumi Y, Inagaki F. Structure of Atg5-Atg16, a Complex Essential for Autophagy. *J Biol Chem.* mars 2007;282(9):6763-72.
349. Geng J, Klionsky DJ. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. *EMBO Rep.* sept 2008;9(9):859-64.
350. Hikita H, Sakane S, Takehara T. Mechanisms of the autophagosome-lysosome fusion step and its relation to non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Res.* 1 sept 2018;2(3):120-4.
351. Hansen M, Rubinsztein DC, Walker DW. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* sept 2018;19(9):579-93.
352. Dossou AS, Basu A. The Emerging Roles of mTORC1 in Macromanaging Autophagy. *Cancers [Internet].* 24 sept 2019 [cité 2 mars 2021];11(10). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6826502/>
353. Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kosmatka M, DePinho RA, et al. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell.* juill 2004;6(1):91-9.
354. Chen C-C, Jeon S-M, Bhaskar PT, Nogueira V, Sundararajan D, Tonic I, et al. FoxOs inhibit mTORC1 and activate Akt by inducing the expression of Sestrin3 and Rictor. *Dev Cell.* 20 avr 2010;18(4):592-604.
355. Shirwany NA, Zou M-H. AMPK in cardiovascular health and disease. *Acta Pharmacol Sin.* sept 2010;31(9):1075-84.
356. Misra P, Chakrabarti R. The role of AMP kinase in diabetes. *Indian J Med Res.* mars 2007;125(3):389-98.
357. Nguyen TMD, Combarrous Y, Praud C, Duittoz A, Blesbois E. Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinases (CaMKKs) Effects on AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Regulation of Chicken Sperm Functions. *PLoS ONE [Internet].* 25 janv 2016 [cité 2 mars 2021];11(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4726612/>
358. Neumann D. Is TAK1 a Direct Upstream Kinase of AMPK? *Int J Mol Sci.* août 2018;19(8):2412.



359. Van Nostrand JL, Hellberg K, Luo E-C, Van Nostrand EL, Dayn A, Yu J, et al. AMPK regulation of Raptor and TSC2 mediate metformin effects on transcriptional control of anabolism and inflammation. *Genes Dev.* 1 oct 2020;34(19-20):1330-44.
360. Sanchez AMJ, Csibi A, Raibon A, Cornille K, Gay S, Bernardi H, et al. AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1. *J Cell Biochem.* févr 2012;113(2):695-710.
361. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* févr 2011;13(2):132-41.
362. Zhang D, Wang W, Sun X, Xu D, Wang C, Zhang Q, et al. AMPK regulates autophagy by phosphorylating BECN1 at threonine 388. *Autophagy.* sept 2016;12(9):1447-59.
363. Kim J, Kim Y, Fang C, Russell R, Kim JH, Fan W, et al. Differential Regulation of Distinct Vps34 Complexes by AMPK in Nutrient Stress and Autophagy. *Cell.* 17 janv 2013;152:290-303.
364. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 25 avr 2008;30(2):214-26.
365. Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol.* janv 2012;32(1):2-11.
366. Audesse AJ, Dhakal S, Hassell L-A, Gardell Z, Nemtsova Y, Webb AE. FOXO3 directly regulates an autophagy network to functionally regulate proteostasis in adult neural stem cells. *PLoS Genet* [Internet]. 11 avr 2019 [cité 2 mars 2021];15(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6478346/>
367. Dh M, Ck Y, Y S, Bt C, Qj W. BECLIN 1-VPS34 COMPLEX ARCHITECTURE: UNDERSTANDING THE NUTS AND BOLTS OF THERAPEUTIC TARGETS. *Front Biol.* 1 oct 2015;10(5):398-426.
368. Erlich S, Mizrachy L, Segev O, Lindenboim L, Zmira O, Adi-Harel S, et al. Differential Interactions Between Beclin 1 and Bcl-2 Family Members. *Autophagy.* 26 nov 2007;3(6):561-8.
369. Decuypere J-P, Parys JB, Bultynck G. Regulation of the Autophagic Bcl-2/Beclin 1 Interaction. *Cells.* 6 juill 2012;1(3):284-312.
370. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* avr 2011;18(4):571-80.



371. Nivon M, Abou-Samra M, Richet E, Guyot B, Arrigo A-P, Kretz-Remy C. NF- κ B regulates protein quality control after heat stress through modulation of the BAG3-HspB8 complex. *J Cell Sci.* 1 mars 2012;125(Pt 5):1141-51.
372. Amir-Zilberstein L, Dikstein R. Interplay between E-box and NF- κ B in Regulation of A20 Gene by DRB Sensitivity-inducing Factor (DSIF) *. *J Biol Chem.* 18 janv 2008;283(3):1317-23.
373. Criollo A, Senovilla L, Authier H, Maiuri MC, Morselli E, Vitale I, et al. The IKK complex contributes to the induction of autophagy. *EMBO J.* 3 févr 2010;29(3):619-31.
374. Comb WC, Cogswell P, Sitcheran R, Baldwin AS. IKK-Dependent, NF- κ B-Independent Control of Autophagic Gene Expression. *Oncogene.* 7 avr 2011;30(14):1727-32.
375. Mariño G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* févr 2014;15(2):81-94.
376. Nazio F, Bordi M, Cianfanelli V, Locatelli F, Cecconi F. Autophagy and cancer stem cells: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Death Differ.* avr 2019;26(4):690-702.
377. Mortensen M, Watson AS, Simon AK. Lack of autophagy in the hematopoietic system leads to loss of hematopoietic stem cell function and dysregulated myeloid proliferation. *Autophagy.* sept 2011;7(9):1069-70.
378. Chang NC. Autophagy and Stem Cells: Self-Eating for Self-Renewal. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2020 [cité 1 févr 2021];8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.00138/full>
379. Riffelmacher T, Simon A-K. Mechanistic roles of autophagy in hematopoietic differentiation. *FEBS J.* 2017;284(7):1008-20.
380. Cao Y, Cai J, Li X, Fang Y, Zhang S, Yuan N, et al. Loss of Autophagy Leads to Megakaryocytes Differentiation Failure and Defective Platelets Function. *Blood.* 6 déc 2014;124(21):4148-4148.
381. Wang Q, You T, Fan H, Wang Y, Chu T, Poncz M, et al. Rapamycin and bafilomycin A1 alter autophagy and megakaryopoiesis. *Platelets.* 2 janv 2017;28(1):82-9.
382. Mohamadimaram M, Allahbakhshian Farsani M, Mirzaeian A, shahsavan S, Hajifathali A, Parkhihdeh S, et al. Evaluation of ATG7 and Light Chain 3 (LC3) Autophagy Genes Expression in AML Patients. *Iran J Pharm Res IJPR.* 2019;18(2):1060-6.



383. Watson AS, Riffelmacher T, Stranks A, Williams O, De Boer J, Cain K, et al. Autophagy limits proliferation and glycolytic metabolism in acute myeloid leukemia. *Cell Death Discov.* 17 août 2015;1(1):1-10.
384. Auberger P, Puissant A. Autophagy, a key mechanism of oncogenesis and resistance in leukemia. *Blood.* 2 févr 2017;129(5):547-52.
385. Sumitomo Y, Koya J, Nakazaki K, Kataoka K, Tsuruta-Kishino T, Morita K, et al. Cytoprotective autophagy maintains leukemia-initiating cells in murine myeloid leukemia. *Blood.* 22 sept 2016;128(12):1614-24.
386. Blunden G, Rhodes CT. Stability of Diosgenin. *J Pharm Sci.* 1 avr 1968;57(4):602-4.
387. Edwards A, Jenkins R, Davenport L, Duke J. Presence of diosgenin in *Dioscorea batatas* (Dioscoreaceae). *Econ Bot.* 24 janv 2009;56:204-6.
388. Raju J, Patlolla JMR, Swamy MV, Rao CV. Diosgenin, a steroid saponin of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* août 2004;13(8):1392-8.
389. Coursey DG. Yams. An account of the nature, origins, cultivation and utilisation of the useful members of the Dioscoreaceae. *Yams Acc Nat Orig Cultiv Util Useful Memb Dioscoreaceae* [Internet]. 1967 [cité 2 mars 2021]; Disponible sur: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19681701429>
390. Turchan-Cholewo J, Liu Y, Gartner S, Reid R, Jie C, Peng X, et al. Increased vulnerability of ApoE4 neurons to HIV proteins and opiates: protection by diosgenin and L-deprenyl. *Neurobiol Dis.* juill 2006;23(1):109-19.
391. Wang L, Ma T, Zheng Y, Lv S, Li Y, Liu S. Diosgenin inhibits IL-1 β -induced expression of inflammatory mediators in human osteoarthritis chondrocytes. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(5):4830-6.
392. Gan Q, Wang J, Hu J, Lou G, Xiong H, Peng C, et al. The role of diosgenin in diabetes and diabetic complications. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1 avr 2020;198:105575.
393. Ghosh S, More P, Derle A, Kitture R, Kale T, Gorain M, et al. Diosgenin Functionalized Iron Oxide Nanoparticles as Novel Nanomaterial Against Breast Cancer. *J Nanosci Nanotechnol.* déc 2015;15(12):9464-72.
394. Chen P-S, Shih Y-W, Huang H-C, Cheng H-W. Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits migration and invasion of human prostate cancer PC-3 cells by reducing matrix metalloproteinases expression. *PloS One.* 2011;6(5):e20164.



395. Lepage C, Léger DY, Bertrand J, Martin F, Beneytout JL, Liagre B. Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells. *Cancer Lett.* 28 févr 2011;301(2):193-202.
396. Mao Z-J, Tang Q-J, Zhang C-A, Qin Z-F, Pang B, Wei P-K, et al. Anti-proliferation and anti-invasion effects of diosgenin on gastric cancer BGC-823 cells with HIF-1 α shRNAs. *Int J Mol Sci.* 2012;13(5):6521-33.
397. Chen Y, Tang Y-M, Yu S-L, Han Y-W, Kou J-P, Liu B-L, et al. Advances in the pharmacological activities and mechanisms of diosgenin. *Chin J Nat Med.* août 2015;13(8):578-87.
398. Leger D, Liagre B, Cardot P, Beneytout J-L, Battu S. Diosgenin dose-dependent apoptosis and differentiation induction in human erythroleukemia cell line and sedimentation field-flow fractionation monitoring. *Anal Biochem.* 1 janv 2005;335:267-78.
399. Liu M-J, Wang Z, Ju Y, Wong RN-S, Wu Q-Y. Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca²⁺ homeostasis. *Cancer Chemother Pharmacol.* janv 2005;55(1):79-90.
400. Jiang Q, Li F, Shi K, Wu P, An J, Yang Y, et al. Involvement of p38 in signal switching from autophagy to apoptosis via the PERK/eIF2 α /ATF4 axis in senite-treated NB4 cells. *Cell Death Dis.* mai 2014;5(5):e1270.
401. Leger D, Liagre B, Cardot P, Beneytout J-L, Battu S. Diosgenin dose-dependent apoptosis and differentiation induction in human erythroleukemia cell line and sedimentation field-flow fractionation monitoring. *Anal Biochem.* 1 janv 2005;335:267-78.
402. Jiang S, Fan J, Wang Q, Ju D, Feng M, Li J, et al. Diosgenin induces ROS-dependent autophagy and cytotoxicity via mTOR signaling pathway in chronic myeloid leukemia cells. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm.* 15 mars 2016;23(3):243-52.
403. LEGER D. 2006. Etude des voies de signalisation cellulaire au cours de l'apoptose et de la différenciation mégacaryocytaire induites par la diosgénine dans la lignée érythroleucémique humaine HEL : rôle anti-apoptotique du léflunomide et voies de transduction du signal activées dans des lignées leucémiques humaines :313. Ph.D. thesis, molecular and cellular biology, faculty of medicine and pharmacy. Limoges University, France.
404. Beneytout JL, Nappez C, Leboutet MJ, Malinvaud G. A plant steroid, diosgenin, a new megakaryocytic differentiation inducer of HEL cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 6 févr 1995;207(1):398-404.



405. Leger D, Battu S, Liagre B, Cardot P, Beneytout JL. Sedimentation field flow fractionation to study human erythroleukemia cell megakaryocytic differentiation after short period diosgenin induction. *J Chromatogr A*. 1 août 2007;1157:309-20.
406. Gao X, Wu J, Zou W, Dai Y. Two ellagic acids isolated from roots of *Sanguisorba officinalis* L. promote hematopoietic progenitor cell proliferation and megakaryocyte differentiation. *Mol Basel Switz*. 24 avr 2014;19(4):5448-58.
407. Ghezali L, Liagre B, Limami Y, Beneytout J-L, Leger DY. Sonic Hedgehog Activation Is Implicated in Diosgenin-Induced Megakaryocytic Differentiation of Human Erythroleukemia Cells. *PLOS ONE*. 16 avr 2014;9(4):e95016.
408. Sell S. Leukemia: stem cells, maturation arrest, and differentiation therapy. *Stem Cell Rev*. 2005;1(3):197-205.
409. Nowak D, Stewart D, Koefler HP. Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development. *Blood*. 16 avr 2009;113(16):3655-65.
410. Gocek E, Marcinkowska E. Differentiation therapy of acute myeloid leukemia. *Cancers*. 16 mai 2011;3(2):2402-20.
411. Klobuch S, Steinberg T, Bruni E, Mirbeth C, Heilmeier B, Ghibelli L, et al. Biomodulatory Treatment With Azacitidine, All-trans Retinoic Acid and Pioglitazone Induces Differentiation of Primary AML Blasts Into Neutrophil Like Cells Capable of ROS Production and Phagocytosis. *Front Pharmacol*. 2018;9:1380.
412. Long MW, Smolen JE, Szczepanski P, Boxer LA. Role of phorbol diesters in in vitro murine megakaryocyte colony formation. *J Clin Invest*. 1 nov 1984;74(5):1686-92.
413. Messaoudi K, Ali A, Ishaq R, Palazzo A, Sliwa D, Bluteau O, et al. Critical role of the HDAC6–cortactin axis in human megakaryocyte maturation leading to a platelet-formation defect. *Nat Commun*. 27 nov 2017;8(1):1786.
414. Cao H, Xu Y, de Necochea-Campion R, Baylink DJ, Payne KJ, Tang X, et al. Application of vitamin D and vitamin D analogs in acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol*. juin 2017;50:1-12.
415. Leger D, Battu S, Liagre B, Cardot P, Beneytout JL. Sedimentation field flow fractionation to study human erythroleukemia cell megakaryocytic differentiation after short period diosgenin induction. *J Chromatogr A*. 1 août 2007;1157:309-20.
416. Colosetti P, Puissant A, Robert G, Luciano F, Jacquiel A, Gounon P, et al. Autophagy is an important event for megakaryocytic differentiation of the chronic myelogenous leukemia K562 cell line. *Autophagy*. 16 nov 2009;5(8):1092-8.



417. Martin P, Papayannopoulou T. HEL Cells: A New Human Erythroleukemia Cell Line with Spontaneous and Induced Globin Expression. *Science* [Internet]. 11 juin 1982 [cité 31 août 2021]; Disponible sur: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.6177045>
418. Leger D, Liagre B, Beneytout J-L. Role of MAPKs and NF- κ B in diosgenin-induced megakaryocytic differentiation and subsequent apoptosis in HEL cells. *Int J Oncol* [Internet]. 1 janv 2006 [cité 14 juin 2020]; Disponible sur: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.28.1.201>
419. Hsc70 - a chaperone protein with diverse cellular functions [Internet]. Novus Biologicals. 2015 [cité 11 févr 2021]. Disponible sur: <https://www.novusbio.com/antibody-news/antibodies/hsc70-a-chaperone-protein-with-diverse-cellular-functions>
420. Atad3a suppresses Pink1-dependent mitophagy to maintain homeostasis of hematopoietic progenitor cells | *Nature Immunology* [Internet]. [cité 13 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/s41590-017-0002-1>
421. Emerging roles of ATG7 in human health and disease. *EMBO Mol Med*. 7 déc 2021;13(12):e14824.
422. Wu Y-T, Tan H-L, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, et al. Dual Role of 3-Methyladenine in Modulation of Autophagy via Different Temporal Patterns of Inhibition on Class I and III Phosphoinositide 3-Kinase. *J Biol Chem*. 2 avr 2010;285(14):10850-61.
423. Raslova H, Baccini V, Loussaief L, Comba B, Larghero J, Debili N, et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates both proliferation of megakaryocyte progenitors and late stages of megakaryocyte differentiation. *Blood*. 15 mars 2006;107(6):2303-10.
424. Drayer AL, Olthof SGM, Vellenga E. Mammalian target of rapamycin is required for thrombopoietin-induced proliferation of megakaryocyte progenitors. *Stem Cells Dayt Ohio*. janv 2006;24(1):105-14.
425. Sun R-J, Yuan D, Liu S-Y, Zhu J-J, Shan N-N. Rapamycin induces megakaryocytic differentiation through increasing autophagy in Dami cells. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb*. juill 2020;31(5):310-6.
426. Liu T, Zhang Z, Yu C, Zeng C, Xu X, Wu G, et al. Tetrandrine antagonizes acute megakaryoblastic leukaemia growth by forcing autophagy-mediated differentiation. *Br J Pharmacol*. déc 2017;174(23):4308-28.
427. Liu Z-J, Italiano J, Ferrer-Marin F, Gutti R, Bailey M, Poterjoy B, et al. Developmental differences in megakaryocytopoiesis are associated with up-regulated



TPO signaling through mTOR and elevated GATA-1 levels in neonatal megakaryocytes. *Blood*. 14 avr 2011;117(15):4106-17.

428. Falcieri E, Bassini A, Pierpaoli S, Luchetti F, Zamai L, Vitale M, et al. Ultrastructural characterization of maturation, platelet release, and senescence of human cultured megakaryocytes. *Anat Rec*. 1 janv 2000;258(1):90-9.
429. Vrbensky JR, Nazy I, Toltl LJ, Ross C, Ivetic N, Smith JW, et al. Megakaryocyte apoptosis in immune thrombocytopenia. *Platelets*. 3 oct 2018;29(7):729-32.
430. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. juin 2018;19(6):349-64.
431. Preparation and Evaluation of Diosgenin Nanocrystals to Improve Oral Bioavailability | SpringerLink [Internet]. [cité 3 mai 2021]. Disponible sur: <https://link.springer.com/article/10.1208/s12249-016-0684-y>
432. Okawara M, Hashimoto F, Todo H, Sugibayashi K, Tokudome Y. Effect of liquid crystals with cyclodextrin on the bioavailability of a poorly water-soluble compound, diosgenin, after its oral administration to rats. *Int J Pharm*. 10 sept 2014;472(1-2):257-61.



Les voies de mort cellulaire et signalisation au cours de la différenciation mégacaryocytaire des cellules érythroleucémiques humaine (HELs) induite par la diosgénine

Les stratégies actuelles pour éradiquer les cellules cancéreuses consistent à induire l'apoptose ou la différenciation. Plusieurs substances naturelles sont utilisées pour réamorcer la différenciation bloquée durant la transformation cancéreuse des cellules. En 2006, Leger et al, ont montré l'implication de l'apoptose durant la différenciation mégacaryocytaire des HELs (lignée érythroleucémique humaine) par 10 μ M de diosgénine. Des études récentes parlent de l'importance de l'autophagie durant la différenciation mégacaryocytaire. Notre travail vise à montrer l'implication d'une autre voie de mort cellulaire nommée « autophagie » dans ce processus. Nos résultats ont montré la stimulation du flux autophagique après le traitement des HELs par 10 μ M de diosgénine. Cette stimulation s'est manifestée par la surexpression de l'Atg7 et l'accumulation de la forme LC3A/B-II au fur et à mesure de la progression de la différenciation. Dans le but d'interroger le rôle de l'autophagie, on a modulé cette voie 2h avant ou après (jours 2 et 4) de l'induction de la différenciation par la diosgénine. On a montré que l'inhibition de l'autophagie par la 3-méthyladénine (3-MA ; 2 mM) réprime la polyploïdie au jours 4 et 8 de la différenciation tandis que l'activation de l'autophagie par metformine (Met ; 0.25 mM) n'induit aucun effet quel que soit le temps de traitement. En outre, on a montré que la modulation de l'autophagie affecte la maturation membranaire (expression génomique de glycoprotéine V) des HELs différenciées par la diosgénine. L'inhibition de l'autophagie avant et après l'induction de la différenciation par la diosgénine réprime fortement l'expression de GpV aux jours 4 et 8. Tandis que l'activation de l'autophagie par la metformine, active significativement l'expression de GpV à la fin de la différenciation indépendamment du temps de traitement. En parallèle, on a montré que la modulation de l'autophagie durant la différenciation mégacaryocytaire induite par la diosgénine (10 μ M) n'affecte pas la fragmentation d'ADN. En résumé, la voie autophagique est impliquée durant la différenciation mégacaryocytaire des HELs induite par la diosgénine (10 μ M). Pour déceler plus précisément le rôle de l'autophagie dans ce processus et son interaction avec la voie apoptotique, plus d'investigation devraient être menés.

Mots-clés : leucémies, différenciation, mégacaryocytes, diosgénine, autophagie, modulation.

Death pathways and signalization during the megakaryocytic differentiation of human erythroleukemia cells (HELs) induced by diosgenin.

Current strategies to eradicate cancer cells consist in inducing apoptosis or differentiation of these cells. Several natural substances are used to reactivate the differentiation that is stopped during the cancerous transformation of cells. In 2006, Leger et al, showed the involvement of apoptosis during megakaryocytic differentiation of HELs (human erythroleukemia cell line) by 10 μ M of diosgenin. Previous studies talked about the autophagy crucial role during the megakaryocytic differentiation. Thus, the objective of our work is to show the involvement of this cell death pathway called "autophagy" in the differentiated HEL cells by diosgenin. Our results show the stimulation of autophagic flux after treatment of HELs with 10 μ M diosgenin. This stimulation is manifested by the overexpression of Atg7 and the accumulation of the LC3-II form as the differentiation progresses. To interrogate the role of autophagy, this pathway was modulated before (2h before) and after (days 2 and 4) the differentiation induction by diosgenin. It was shown that inhibition of autophagy by 3-methyl adenine (3-MA ; 2 mM) represses polyploidy on days 4 and 8 of differentiation while activation of autophagy by metformin (Met ; 0.25 mM) induces no effect regardless of treatment time. Furthermore, modulation of autophagy was shown to affect membrane maturation (glycoprotein V genomic expression) of diosgenin-differentiated HELs. Inhibition of autophagy before and after induction of differentiation by diosgenin, strongly represses GpV expression at days 4 and 8. Whereas activation of autophagy by metformin, activates GpV expression at the end of the differentiation regardless of the treatment time. In parallel, it was shown that modulation of autophagy during HEL megakaryocytic differentiation induced by diosgenin (10 μ M) does not affect the DNA fragmentation. In summary, the autophagic pathway is involved during diosgenin (10 μ M) induced megakaryocytic differentiation of HELs. To further elucidate the role of autophagy in this process and its interaction with the apoptotic pathway, more investigations should be conducted.

Key-words : leukemia, differentiation, megakaryocytes, diosgenin, autophagy, modulation.

