



**HAL**  
open science

# Rôle des Immunoglobulines A1 dans la régulation positive de l'érythropoïèse

S. Coulon

► **To cite this version:**

S. Coulon. Rôle des Immunoglobulines A1 dans la régulation positive de l'érythropoïèse. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud - Paris XI, 2009. Français. NNT: . tel-00442596

**HAL Id: tel-00442596**

**<https://theses.hal.science/tel-00442596>**

Submitted on 22 Dec 2009

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

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

**UNIVERSITE PARIS XI**  
**FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD**

Année universitaire 2009-2010

N° de Bibliothèque :

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI**

Champ disciplinaire : Biochimie, Biologie cellulaire et moléculaire

Ecole doctorale de Cancérologie

Présentée et soutenue publiquement par

**Séverine COULON**

Le 21 Décembre 2009

**Rôle des Immunoglobulines A1 dans la régulation positive de l'érythropoïèse**

**Jury :**

Président : Professeur William VAINCHENKER

Directeur de thèse : Professeur Olivier HERMINE

Rapporteur : Professeur Nicole CASADEVALL

Rapporteur : Professeur Michel COGNE

Examineur : Professeur Pierre AUCOUTURIER

## Résumé

L'érythropoïétine (Epo) est la principale cytokine contrôlant l'érythropoïèse. Les concentrations d'Epo retrouvées dans la circulation sont sous-optimales et ne permettent la survie que d'une partie des érythroblastes de la moelle osseuse. Dans cette étude, nous avons cherché à identifier des facteurs modulant la sensibilité des érythroblastes à l'Epo. Les érythroblastes expriment fortement le récepteur de la transferrine (CD71/RTf1), précédemment identifié comme un récepteur des Immunoglobulines A1 (IgA1).

Nous montrons que chez l'Homme, le taux d'IgA1 polymériques (pIgA1) dans la moelle osseuse est augmenté par rapport au sérum et que les concentrations sériques de pIgA1 sont plus importantes chez des patients soumis à une hypoxie chronique par rapport aux volontaires sains. En concentration sous-optimale d'Epo, la liaison des pIgA1 au RTf1 permet de rétablir la prolifération cellulaire des érythroblastes. Cette activation du RTf1 implique l'activation des voies de signalisation MAPK/ERK et PI3K/AKT, mais pas de la voie JAK2/STAT5. *In vivo*, lors de l'induction d'anémies hémolytiques dans deux modèles murins (souris *knock-in* pour la chaîne lourde des IgA1 humaines et souris NODSCID injectées avec des pIgA1 humaines), les souris exposées aux IgA1 ont présenté un nombre accru d'érythroblastes spléniques rapport au contrôle, et ont restauré plus rapidement leur hémocrite. Nos résultats montrent que l'interaction pIgA1/TfR1 module la sensibilité des érythroblastes à l'Epo dans des situations physiologiques et pathologiques, apparaissant ainsi comme un régulateur positif de l'érythropoïèse.

Mots clé : Erythropoïèse, Récepteur de la transferrine 1, Immunoglobuline A.

## Summary

Erythroblasts survival, proliferation, and differentiation are tightly controlled by erythropoietin (Epo). Circulating Epo levels are suboptimal and only a fraction of bone marrow (BM) progenitors survives to produce erythrocytes presumably because erythroblasts are heterogeneous in their sensitivity to Epo. Therefore, identification of factors modulating Epo requirement is crucial to the understanding of erythropoiesis homeostasis. Erythroblasts highly express the transferrin receptor (TfR1/CD71), previously identified as an IgA1 receptor. Herein we show that under sub-optimal (physiological) concentrations of Epo polymeric (p)IgA1 rescued clonogenic potential of erythroblasts. pIgA1 levels were high in human BM aspirates and enhanced in sera under hypoxic stress. pIgA1 bound TfR1 on erythroblasts and triggered the activation of pro-proliferative PI3K/Akt and MAPK pathways but not of that of STAT5 and JAK2, which are activated by Epo-R. We evaluated *in vivo* the action of pIgA1 in two mice models: NOD-SCID mice injected with pIgA1 and mice knock-in for the IgA1 human heavy chain. In both cases, the presence of pIgA1 enhanced the number of erythroid precursors in spleen and rescued mice from acute anemia. Therefore, pIgA1 modulate erythroblast sensitivity to growth factors in physiological and pathological situations thus emerging as a previously unsuspected regulator of erythropoiesis.

Key words : Erythropoiesis, Transferrin receptor 1, Immunoglobulin A.

# Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté de participer au jury de ma thèse et d'avoir consacré du temps à ce travail.

Je remercie vivement Olivier Hermine de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir fait découvrir le monde fascinant de l'hématologie et plus particulièrement de l'érythroïèse.

Je tiens aussi à remercier Ivan Moura, qui a pris le temps de m'apprendre tout ce qu'il a fallu pour réaliser ce travail. Tu as aussi réussi à me transmettre ta passion pour la recherche scientifique et je t'en suis très reconnaissante.

On m'avait prévenue que la réalisation d'une thèse n'était pas possible sans l'appui de son entourage et je m'en suis vite rendue compte. Alors merci beaucoup, Jean-François, de ton soutien indéfectible pendant ces 4 années. Je remercie aussi Rémi d'être là et d'être mon petit soleil de tous les jours.

Je souhaite aussi vivement remercier la OH team pour tous les bons moments passés ensemble durant ces 4 ans.

Tout d'abord, je n'oublie pas les anciens, Dani et son sourire à vous rendre gaie la pire journée d'Octobre ; Hassen (tu n'étais pas de notre équipe mais je t'aimais bien quand même) ; Seb, ses coups de gueule (mais oui je vais le payer le café !) et son cœur de guimauve ; Joëlle alias jojo la bricole et sa perceuse.

Puis, merci aux fossiles qui sont toujours là : AMD alias le ché du labo ; Pierre alias Peter alias Roger alias celui qui garde ses souris en douce dans la centrifugeuse ; Céline, la deuxième blonde de la bande à Moura et Julie, ma wonder copine.

Enfin, merci à celles qui nous ont rejoint ces dernières années, dont Sophie pour nos interminables discussions bébé/babycook/jouet club (désolée pour les autres qui ont dû supporter ça), Geneviève et Anne-Sophie, notre post-doc de choc.

Beaucoup de personnes m'ont aidée sur le sujet des IgA dans l'érythroïèse et je les en remercie. Je remercie particulièrement Michael (Kael) : on a été Monsieur et Madame Scramblase (comme dirait Hassen), mais on a eu plus de chance avec les IgA ! Je te souhaite plein de courage pour ta thèse et une belle carrière devant toi. Je remercie aussi Damien pour sa bonne humeur journalière et son

travail sans faille. Enfin, merci « aux petites stagiaires » Faustine et Sophie, qui se sont initiées à la recherche avec plus ou moins de bonheur.

Je remercie aussi l'équipe de l'U699 qui m'a toujours accueillie avec gentillesse et disponibilité. Tout d'abord, je remercie Renato Monteiro qui m'a donné les moyens d'effectuer les expériences dans son unité ; Marc Benhamou pour le temps qu'il a consacré à la relecture du papier ; Pamella et Houda, les filles de l'Ivan's team de Bichat pour leur précieuse aide ; Meetu et Saurabh pour leur gentillesse (et leurs plasmides) ; Jérôme pour sa courte carrière de chercheur ; Myriem, Gaëtan, Nico et tous les autres...

Merci à Anne-Florence, la secrétaire de choc d'Olivier, qui m'aide sans relâche depuis le début de ma thèse. Je te souhaite beaucoup de bonheur dans ta vie personnelle et professionnelle.

4 ans à arpenter les couloirs...c'est sûr, on crée des liens. Alors, merci beaucoup aux membres de l'unité 8147 et son directeur Michel Dy.

Tout d'abord, merci à mes copines de culture, Emilie et Pascaline, d'avoir partagé tant de bons moments de papotage entre deux centri. Merci à la sympathique équipe de l'aquarium, Séverine D, Rachel, Mélanie, François, et à la nouvelle et néanmoins aussi très sympathique équipe de Francine Cote. Merci à Odile Devergne pour ses conseils scientifiques.

Merci à Catherine et Fabienne, ainsi que Dominique et Nadia pour leur aide quotidienne.

Merci à mes parents de m'avoir soutenue pendant toutes mes années d'études, ainsi que pour la relecture et la correction des fautes d'orthographe de mes thèses.

Merci à mes très chères amies thésardes Anne, Delphine, Laure (on se connaît depuis si longtemps et ...on se retrouve à faire toutes une thèse !), ainsi que Mathieu, Olivier et Brice. Merci aussi à mes autres amies très chères Géraldine, Val et Mag.

Enfin, merci à toute la marmaille qui, il y a 4 ans, n'était pas là : Anoa, Amanda, Roman, Arthur, Mathias, Camille, Raphael, Alexandre, Esteban, Johana...

# Sommaire

Sommaire .....	3
Abréviations .....	5
Table des illustrations.....	8
Avant-propos.....	10
Introduction.....	11
1 Généralités sur l'érythropoïèse .....	11
1.1 Les différents stades de la maturation érythroïde.....	11
1.2 Organes de l'érythropoïèse : du développement embryonnaire à l'âge adulte .....	13
1.3 Engagement vers le lignage érythroïde : Rôle de GATA-1.....	17
2 Régulation positive de l'érythropoïèse .....	19
2.1 Régulation endocrine par l'érythropoïétine.....	20
2.2 Régulation paracrine par le Stem Cell Factor .....	27
2.3 Mécanismes de coopération entre le C-Kit et le R-Epo.....	30
3 Principales voies de signalisations activées lors de l'érythropoïèse .....	33
3.1 STAT5a-b.....	33
3.2 Voie PI3K/AKT.....	34
3.3 Voie MAPK.....	36
3.4 Voie des src kinases.....	38
3.5 Calcium .....	39
3.6 Bruton tyrosine kinase.....	39
4 Place du récepteur de la transferrine dans l'érythropoïèse .....	40
4.1 Récepteurs de la transferrine : RTf1 et RTf2 .....	40
4.2 Rôle du RTf dans la captation du fer par les érythroblastes .....	49
4.3 Ligands du RTf1.....	53
Problématique et objectifs de l'étude.....	65
Résultats.....	67
Discussion et perspectives .....	97
1 Les plgA1 régulent positivement l'érythropoïèse .....	97
1.1 plgA1 : un nouvel acteur modulant la sensibilité des érythroblastes à l'Epo .....	97
1.2 Les plgA1 amplifient l'érythropoïèse de stress lors d'une anémie .....	100
1.3 Ciblage du RTf1 : une nouvelle cible thérapeutique .....	102
2 L'activation du RTf1 induit et amplifie des voies de prolifération cellulaire.....	103
2.1 Le RTf1 permet l'activation cellulaire.....	104
2.2 Quels seraient les effecteurs du RTf1 ?.....	104
2.3 Implication des différents ligands dans la signalisation du RTf1.....	109

3	Erythropoïèse chez les patients déficitaires en IgA.....	111
4	Régulation de la production des plgA1 en situation d'hypoxie .....	113
5	Rôle de la liaison RTf1/plgA dans d'autres modèles physiopathologiques ?.....	115
	Bibliographie.....	117
	Annexe : Liste des publications .....	147
1	Articles scientifiques.....	147
2	Revue .....	148

# Abréviations

ACO1 :	Aconitase Cytosolique
AGM :	Aorta-Gonad-Mesonephros
ALA :	$\delta$ -aminolevulinate
ALAS:	$\delta$ -aminolevulinate synthase
AHAI :	Anémie Hémolytique Auto-Immune
Apo-Tf:	Apo-transferrine
Bcl-XL	B-Cell Lymphoma-XL
BFU-E :	Burst Forming Unit-Erythroid
BFU-Es :	BFU-E de stress
BTG1 :	B cell translocation gene 1
Btk :	Bruton's tyrosine kinase
CD34/36 :	Cluster of differentiation 34 et Cluster of differentiation 36
CFU-GEMM :	Colony Forming Unit-Granulocyte Erythrocyte Megacaryocyte Macrophage
CFU-E :	Colony Forming Unit-Erythroid
CFU-S :	Colony-Forming Unit-Spleen
CM :	Cellules Mésangiales
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMP :	Progéniteurs Myéloïdes Communs
CSH :	Cellules Souches Hématopoïétiques
DlgA :	Déficit sélectif en IgA
DMT1 :	Divalent Metal Transporter 1
ECM :	Matrice Extracellulaire
EKLF :	Erythroid Krüppel-like factor
Epo :	Erythropoïétine
Erk :	Extracellular signal-regulated kinase
EryP-CFC :	Primitive Erythroid Progenitors
EP :	Erythrophagocytose
ES:	Cellules Souches Embryonnaires
ESA :	Agents stimulateurs de l'érythropoïèse
FACS :	Fluorescence activated cell sorter
Fc :	Crystalizable fragment
Fe-Tf:	Ferro-transferrine

FIH :	Factor inhibiting HIF
GM-CSF :	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPA :	Glycophorine A
GSK3 :	Glycogen Synthetase Kinase-3
HFE	Protéine de l'Hémochromatose
HRE :	Hypoxia Responsive Element
HSP :	Heat Shock Proteins
HO-1	Hème oxygénase 1
Ht :	Hématocrite
IAP :	Inhibitor of Apoptosis Protein
Ig :	Immunoglobuline
IRE	Iron Responsive Element
IGF-1	Insuline-like Growth Factor-1
IL :	Interleukine
IRE :	Iron Responsive Element
IRP :	Iron Regulatory Protein
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
JH:	JAK-homology
kDa :	kilo Dalton
KI :	Knock-In
KO :	Knock-Out
LAM :	Leucémies Aigues Myéloïdes
LCR	Locus Control Region
LT	Lymphocyte T
PHD :	Prolines Hydroxylases
PHA :	Phytohemagglutinine
PKC :	Protéine Kinase C
PCK2	Protéine Caséine Kinase 2
PMA :	Phorbol Myristate Acetate
PTI :	Purpura Thrombopénique Idiopathique
PV :	Polyglobulie de Vaquez/Polycythaemia Vera
MAPK :	Mitogen activated protein kinase
M-CSF:	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MGG :	May-Grünwald Giemsa

Mek :	MAPK/Erk kinase
MEPs :	Progéniteurs bipotentiels Mégacaryocytaires/Erythroïdes
mIgA :	IgA monomérique
N-IgA:	Néphropathie à IgA
NPS :	Nitroprussiate de sodium
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PHA :	Phytohémagglutinine
PMA :	Phorbol Myristate Acetate
pIgA :	IgA polymérique
PLC $\gamma$ :	Phospholipase C $\gamma$
PiP3 :	3' Phospho-inositol
PKB/AKT :	Protéine Kinase B
PI-3Kinase :	Phosphatidylinositol 3-kinase
pO <sub>2</sub> :	Pression partielle en Oxygène
R-Epo :	Récepteur de l'Erythropoïétine
rHuEpo :	Erythropoïétine recombinante humaine
RTf :	Récepteur de la Transferrine
RFc :	Récepteur des fragments Fc des Immunoglobulines
Rplg :	Récepteur des Immunoglobulines polymériques
SCF :	Stem Cell Factor
SHIP :	SH2-containing Inositol Phosphatase
slgA :	IgA sécrétoires
STEAP3 :	Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate
TCR :	Récepteur aux cellules T
Tf :	Transferrine
TGF- $\beta$ :	Transforming Growth Factor-beta
TPO :	Thrombopoïétine
TRAIL :	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRCP:	Transient Receptor Potential Channel
VHL :	Von Hippel Lindau

# Table des illustrations

Figure 1: Différents stades de l'érythropoïèse.....	12
Figure 2: Mise en évidence des différents stades de l'érythropoïèse selon l'expression différentielle de marqueurs de surface .....	13
Figure 3: Les trois étapes de l'érythropoïèse au cours du développement embryonnaire, foetal et post-natal (selon (Palis, 2008)).....	15
Figure 4 : Niche des cellules souches hématopoïétiques (d'après (Blank et al., 2008)). .....	16
Figure 5 : Représentation schématique de la structure de GATA-1 (selon (Ferreira et al., 2005)).....	17
Figure 6 : Expression de GATA-1 et de GATA-2 au cours de l'érythropoïèse (selon (Ohneda and Yamamoto, 2002)).....	18
Figure 7 : Régulation endocrine de la production d'Epo par le rein .....	22
Figure 8 : Régulation du facteur HIF en fonction des taux d'oxygène (Schofield and Ratcliffe, 2004) .	23
Figure 9 : Domaines structurels du récepteur de l'érythropoïétine (selon (Richmond et al., 2005))...	24
Figure 10 : Liaison de l'Epo à son récepteur homodimérique et initiation de la transduction du signal (Bunn, 2007) .....	25
Figure 11 : Représentation schématique de la structure du SCF .....	28
Figure 12 : Structure simplifiée du récepteur C-Kit (d'après (Arock, 2004)).....	30
Figure 13 : Cinétique d'expression du C-Kit et du R-Epo au cours de l'érythropoïèse .....	31
Figure 14 : Schéma récapitulatif des mécanismes de coopération entre le C-Kit et le R-Epo .....	32
Figure 15 : Représentation schématique des différents effecteurs de la voie PI3K/AKT .....	36
Figure 16 : Représentation schématique du récepteur de la transferrine (A- (Daniels et al., 2006b) et B-(Lawrence et al., 1999)) .....	42
Figure 17 : Les protéines IRP contrôlent la stabilité du récepteur de la transferrine (d'après (Kerenyi et al., 2008)) .....	44
Figure 18 : Rôle de l'hypoxie dans le maintient de l'homéostasie du fer (Peyssonnaud et al., 2008)..	45
Figure 19 : Schéma hypothétique de l'expulsion du RTf1 dans les exosomes au stade réticulocyte (Pan and Johnstone, 1983) .....	48
Figure 20 : Schéma récapitulatif de l'homéostasie du fer (Andrews, 2008). .....	49
Figure 21 : Capture cellulaire du Fer lié à la Tf par le RTf (Daniels et al., 2006a).....	50
Figure 22 : Structure de l'hémoglobine humaine adulte ( $\alpha_2\beta_2$ ) (droite) et de l'hème (gauche) .....	51
Figure 23 : Modélisation du complexe RTf1-Tf (d'après (Cheng et al., 2004)).....	53
Figure 24 : Rôle du RTf1 dans la signalisation de l'hepcidine (Schmidt et al., 2008) .....	55
Figure 25 : Différents types d'IgA (van Egmond et al., 2001).....	58

Figure 26 : Différences structurelles entre les IgA1 et les IgG (d'après (Boehm et al., 1999)) .....	59
Figure 27 : Représentation de la structure planaire d'une IgA1 dimérique (Bonner et al., 2008).....	60
Figure 28 : Schéma récapitulatif de l'implication du RTf dans la néphropathie à IgA (Tamouza et al., 2007).....	63
Figure 29 : Schéma récapitulatif du transport des complexes IgA-gliadine médié par le RTf dans la maladie coeliaque (Matysiak-Budnik et al., 2008).....	64
Figure 30 : Régulation du pool médullaire d'érythroblastes selon les concentrations d'érythropoïétine .....	65
Figure 31 : Modèle résumant le rôle de Gas6 dans l'érythropoïèse (Angelillo-Scherrer et al., 2008)..	99
Figure 32 : Séquence protéique du RTf1 .....	106
Figure 33 : Schéma de la structure des différentes isoformes des PKC (Mackay and Twelves, 2007)	107
Figure 34 : Compétition entre A24 et la Fe-Tf dans la liaison au RTf1 ((Moura et al., 2004b) et pour revue (Callens et al., 2008)).....	109
Figure 35 : Schéma d'agrégation de RTf1 chimériques possédant un domaine de liaison à la streptavidine à leur extrémité.....	111

# Avant-propos



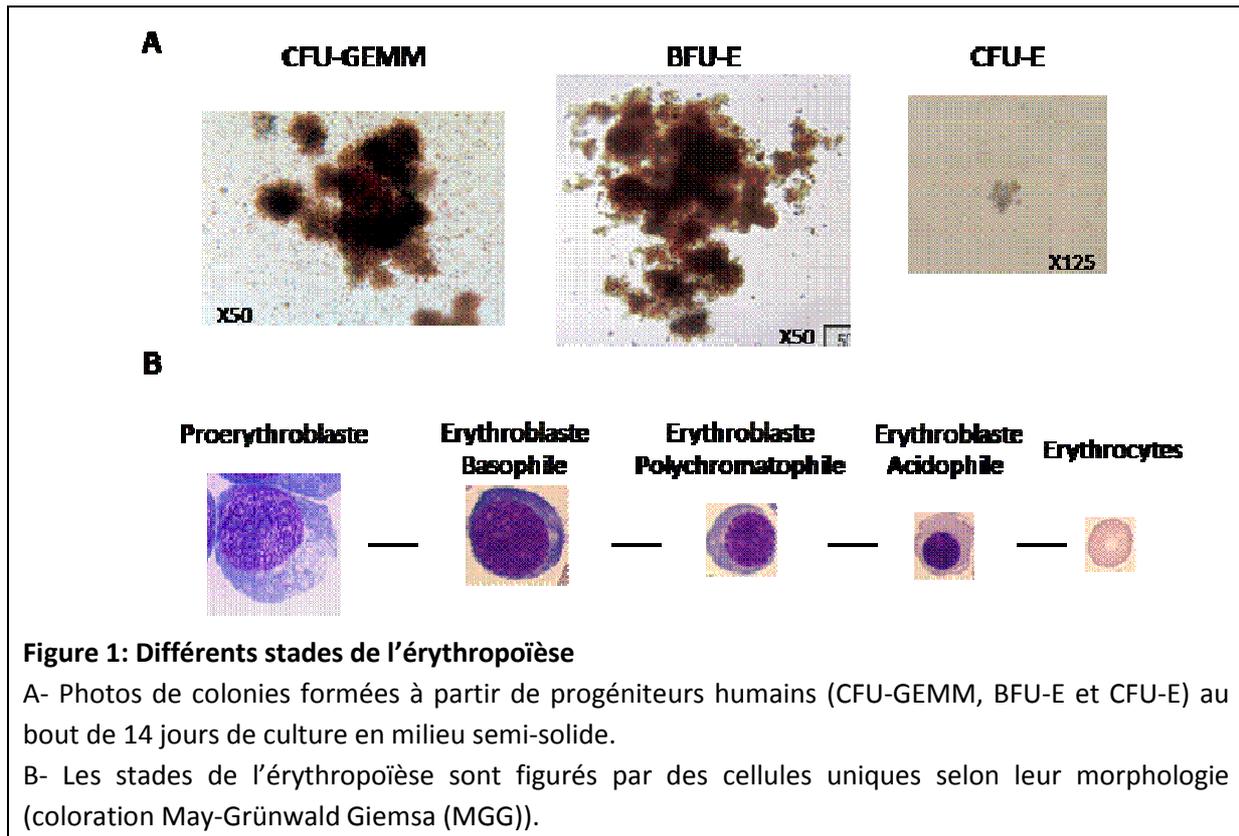
L'érythropoïèse est le processus de formation de globules rouges. En effet, érythro est tiré du grec ερυθρός qui veut dire « rouge », en référence à la couleur que prennent les cellules en produisant l'hémoglobine nécessaire au transport de l'oxygène. L'érythropoïèse est un phénomène permanent. Elle débute lorsqu'une cellule souche pluripotente (pouvant donner naissance à n'importe quelle cellule sanguine) s'engage en progéniteur érythroïde qui, par des phénomènes de prolifération et de maturation, donnera naissance à des érythrocytes. La proportion de progéniteurs érythroïdes dans la moelle osseuse est faible (moins d'1 % des cellules). Toutefois, on estime la production moyenne de globules rouges à 10 milliards de cellules par heure. Il existe donc une remarquable expansion du compartiment érythroïde. Cette dernière est finement régulée afin d'éviter une production trop importante ou, au contraire, insuffisante d'érythrocytes. Ainsi, en situation de stress (hémorragie aiguë, hémolyse ou manque d'oxygène), la production de globules rouges peut augmenter jusqu'à 7 fois afin de s'adapter aux besoins de l'organisme. L'élément clé de cette régulation est incontestablement l'érythropoïétine (Epo). En effet, ce facteur de croissance, produit par le rein, est absolument essentiel aux érythroblastes, en agissant sur leur survie et leur prolifération. Par ailleurs, les érythroblastes ont d'importants besoins en fer afin de synthétiser l'hémoglobine nécessaire au transport de l'oxygène. Pour capter ce fer, ils expriment à leur surface une forte densité de récepteur de la transferrine, qui permet l'internalisation du fer lié à la transferrine. Il a été montré que le récepteur de la transferrine pouvait également lier les immunoglobulines (Ig) de type A1 produites par les plasmocytes. Toutefois, au début de ma thèse, bien qu'une partie des plasmocytes à IgA soit retrouvée dans la moelle osseuse, le rôle des IgA1 dans l'érythropoïèse n'avait jamais été envisagé. C'est pourquoi, j'ai voulu savoir si ces protéines du système immunitaire pouvaient jouer un rôle dans l'érythropoïèse par leur interaction avec un récepteur habituellement connu pour faire rentrer le fer. J'ai ainsi montré que les IgA1 sensibilisaient les érythroblastes à l'Epo, et permettaient leur survie par potentialisation des voies de signalisation PI3K/AKT et ERK1/2. Dans un deuxième temps, j'ai caractérisé dans quels contextes physiopathologiques intervenaient les IgA1 et démontré que leur production était régulée. Enfin, j'ai montré, dans plusieurs modèles d'anémie, que l'activation du récepteur de la transferrine pouvait présenter une cible thérapeutique attractive. C'est l'ensemble de ces résultats que je détaille dans cette thèse.

# Introduction

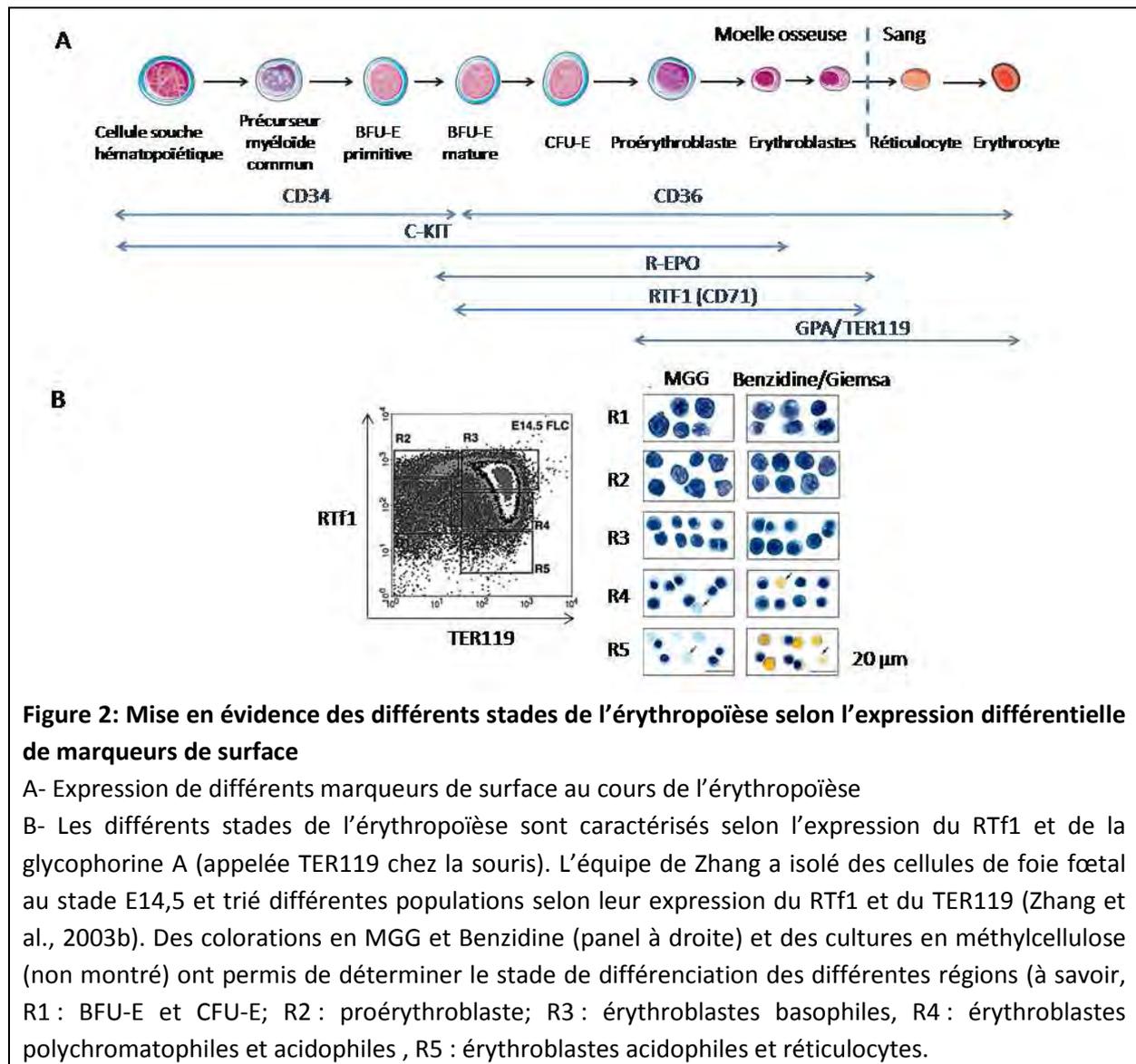
## 1 Généralités sur l'érythropoïèse

### 1.1 Les différents stades de la maturation érythroïde

L'érythropoïèse est le processus de formation des érythrocytes. Comme les autres cellules hématopoïétiques, les érythrocytes de l'homme adulte proviennent de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les CSH s'engagent dans une voie de différenciation myéloïde vers un progéniteur myéloïde multipotent CFU-GEMM (Colony Forming Unit-Granulocyte Erythrocyte Mégacaryocyte Macrophage) qui va ensuite se différencier vers un progéniteur restreint dans la voie érythroïde. L'identification des progéniteurs érythroïdes s'effectue classiquement par la caractérisation de colonies en milieu semi-solide en présence de cytokines. Ainsi, les BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid) permettent la formation de larges colonies contenant plus de 200 érythroblastes en 14 jours, tandis que les CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid) donnent naissance à de petites colonies d'érythroblastes en 7 Jours (Figure 1A). Les progéniteurs érythroïdes deviennent ensuite des précurseurs érythroblastiques morphologiquement reconnaissables et qui sont localisés au niveau médullaire au sein d'une structure particulière, l'îlot érythroblastique centré sur un macrophage nourricier (Bessis, 1958). Les précurseurs érythroïdes représentent 20 à 30% des cellules nucléées d'une aspiration médullaire. La maturation entre le premier stade identifiable (proérythroblaste) et l'érythroblaste polychromatophile s'accompagne d'une forte prolifération (associée à une différenciation) qui décroît ensuite jusqu'au stade réticulocyte (Figure 1B). D'un point de vue morphologique, la taille des cellules décroît lors de la maturation terminale, passant de 25 microns pour un proérythroblaste à 9 microns pour un érythroblaste acidophile. Le rapport nucléocytoplasmique diminue progressivement au fur et à mesure que la chromatine se condense. Le cytoplasme initialement basophile devient acidophile de façon simultanée à la synthèse de l'hémoglobine. L'expulsion nucléaire survient dans la moelle au stade acidophile. Les noyaux expulsés, entourés d'une fine couche de cytoplasme, sont phagocytés par les cellules histiomonocytaires, en particulier les macrophages du centre des îlots érythroblastiques. Ces globules rouges immatures, du nom de réticulocytes, ont une taille plus grande que l'hématie mature (>100fl) et contiennent encore des ribosomes formant un réseau lâche visible après coloration au bleu de Crésyl. Dans le sang périphérique, les réticulocytes sont présents pendant 2 à 3 jours avant de devenir des hématies.



Les différents stades de l'érythropoïèse peuvent aussi être mis en évidence par l'acquisition ou la perte d'un certain nombre de marqueurs de surface (Figure 2A). En effet, les progéniteurs érythroïdes les plus précoces expriment l'antigène CD34 et le récepteur au *Stem Cell Factor* (SCF) C-Kit. A partir du stade BFU-E, le récepteur à l'érythropoïétine (R-Epo) commence à être exprimé avec un maximum d'expression au niveau des CFU-E. Cependant, celui-ci est difficilement détectable par cytométrie en flux en raison de la faible densité de récepteur présent à la surface des cellules. L'antigène CD36 est également retrouvé mais celui-ci est également présent sur les mégacaryocytes et les monocytes matures. Classiquement, on distingue différentes populations de précurseurs érythroblastiques par cytométrie en flux selon leur taille, l'expression du récepteur de la transferrine (RTf1 ou CD71) et de la glycophorine A (appelé TER119 chez la souris). Ainsi, on peut identifier les proérythroblastes murins (TER119<sup>med</sup>, RTf1<sup>high</sup>, FSC<sup>high</sup>), les érythroblastes basophiles (TER119<sup>high</sup>, RTf1<sup>high</sup>, FSC<sup>high</sup>), les érythroblastes basophiles tardifs et polychromatophiles (TER119<sup>high</sup>, RTf1<sup>high</sup>, FSC<sup>low</sup>), et enfin les érythroblastes acidophiles et réticulocytes (TER119<sup>high</sup>, RTf1<sup>low</sup>, FSC<sup>low</sup>) (Liu et al., 2006; Zhang et al., 2003b) (Figure 2B).



**Figure 2: Mise en évidence des différents stades de l'érythropoïèse selon l'expression différentielle de marqueurs de surface**

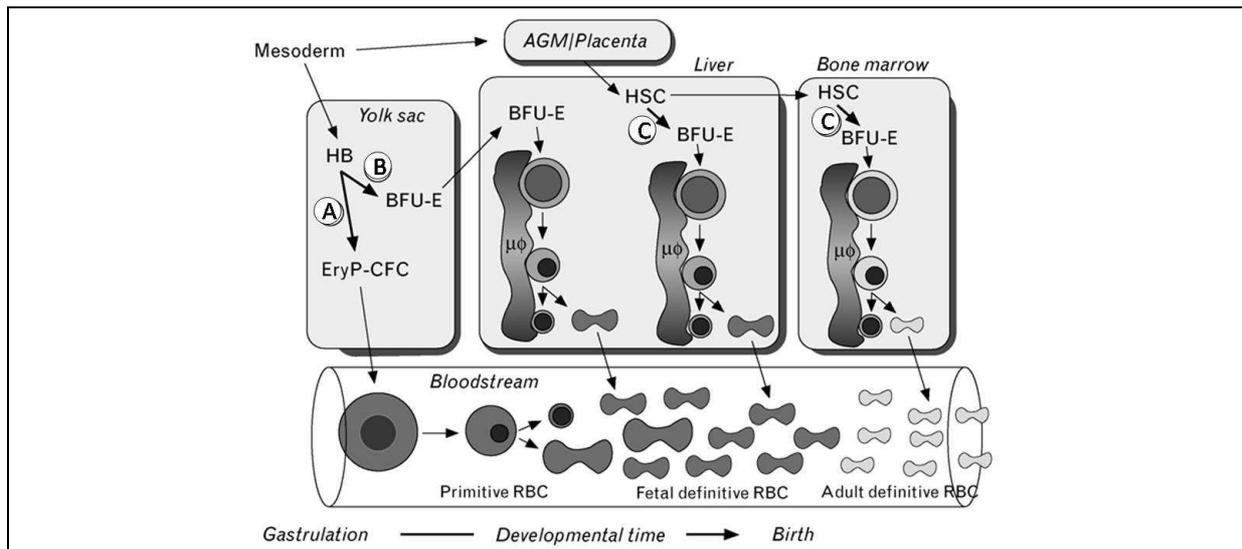
A- Expression de différents marqueurs de surface au cours de l'érythropoïèse

B- Les différents stades de l'érythropoïèse sont caractérisés selon l'expression du RTf1 et de la glycophorine A (appelée TER119 chez la souris). L'équipe de Zhang a isolé des cellules de foie fœtal au stade E14,5 et trié différentes populations selon leur expression du RTf1 et du TER119 (Zhang et al., 2003b). Des colorations en MGG et Benzidine (panel à droite) et des cultures en méthylcellulose (non montré) ont permis de déterminer le stade de différenciation des différentes régions (à savoir, R1 : BFU-E et CFU-E; R2 : proérythroblaste; R3 : érythroblastes basophiles, R4 : érythroblastes polychromatophiles et acidophiles , R5 : érythroblastes acidophiles et réticulocytes.

## 1.2 Organes de l'érythropoïèse : du développement embryonnaire à l'âge adulte

L'érythropoïèse est un processus qui se déroule dans différents organes au cours du développement. En effet, *in utero*, les premiers érythrocytes appelés primitifs ou embryonnaires sont retrouvés dans les îlots sanguins du sac vitellin. Les cellules primitives érythroïdes semblent avoir un précurseur commun avec les cellules endothéliales qui exprime le facteur de transcription érythroïde GATA-1 (Choi et al., 1998; Yokomizo et al., 2007). Au stade E8.25 de gestation, lors des premières contractions cardiaques, les érythroblastes immatures primitifs ou EryP-CFC pour primitive *erythroid progenitors* commencent à passer dans la circulation. A ce stade, un processus de différenciation

commence à avoir lieu et se traduit par un nombre de division diminué, l'acquisition de l'hémoglobine, une condensation nucléaire associée à une diminution de taille cellulaire et finalement l'énucléation (Fraser et al., 2007; Kingsley et al., 2004). Le processus d'énucléation aboutit à la formation de réticulocytes et de pyrénocytes qui sont des cellules nucléées riches en globine. Les pyrénocytes sont rapidement phagocytés par les macrophages du fait d'une répartition asymétrique de la phosphatidylsérine à leur membrane (McGrath et al., 2008). Du stade E9.5 au stade E10, les progéniteurs érythroïdes synthétisés au niveau du sac vitellin colonisent le foie fœtal avant de passer dans la circulation (Lux et al., 2008). Par la suite, les progéniteurs sont issus de cellules souches provenant du placenta ((Mikkola et al., 2005) pour revue) ou de la région intra-embryonnaire péri-aortique (AGM pour aorta-gonad-mesonephros) (Medvinsky and Dzierzak, 1996). Les progéniteurs érythroïdes fœtaux sont très semblables aux progéniteurs adultes. Cependant, les BFU-E fœtaux ont une capacité proliférative plus importante et prolifèrent *in vitro* uniquement sous érythropoïétine (Emerson et al., 1989; Migliaccio and Migliaccio, 1988). A la fin de gestation, la synthèse des progéniteurs érythroïdes passe du foie fœtal à la moelle osseuse nouvellement formée. Les différentes étapes de l'érythropoïèse embryonnaire et fœtale sont résumées dans la figure 3.



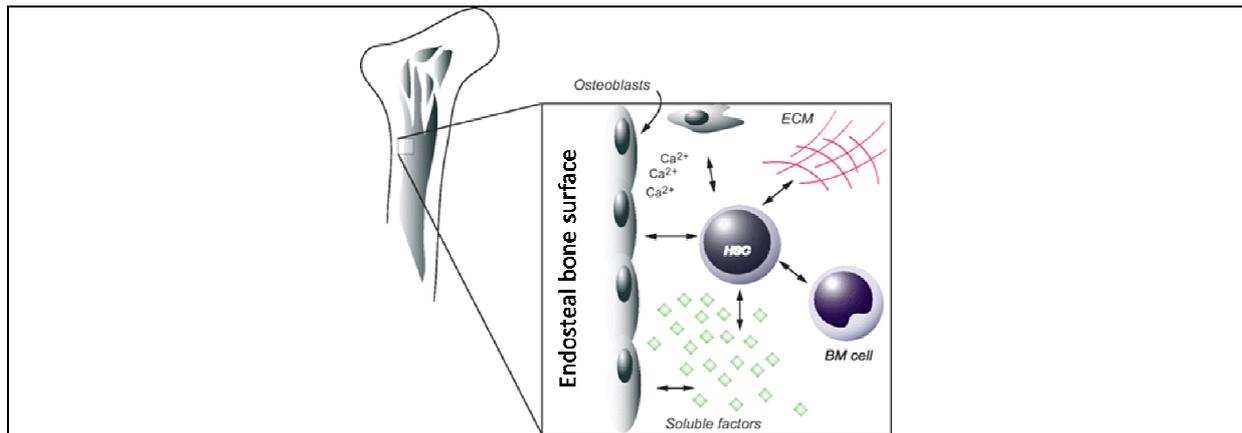
**Figure 3: Les trois étapes de l'érythropoïèse au cours du développement embryonnaire, fœtal et post-natal (selon (Palis, 2008))**

A- Les progéniteurs embryonnaires (EryP-CFC) proviennent de précurseurs sanguins (HB, *hemangioblast precursors*) issus du sac vitellin et produisent un grand nombre de précurseurs érythroïdes. Ces précurseurs se différencient en érythrocytes (RBC pour *Red Blood Cell*) dans la circulation sanguine.

B- Lors d'une phase transitoire, les BFU-E sont synthétisés au niveau du sac vitellin puis migrent vers le foie fœtal où ils prolifèrent et se différencient. Après énucléation, les érythrocytes passent dans la circulation.

C- En fin de gestation, les progéniteurs érythroïdes sont issus de cellules souches hématopoïétiques (HSC). Ces progéniteurs prolifèrent dans le foie en fin de gestation et dans la moelle osseuse à partir de la naissance. Contrairement aux cellules érythroïdes primitives, les précurseurs érythroïdes se différencient au niveau extra-vasculaire au sein d'un îlot érythroblastique centré sur un macrophage nourricier ( $\mu\Phi$ ).

Dès la naissance et durant toute la vie adulte, le principal organe hématopoïétique est la moelle osseuse. Dans cet environnement sont retrouvées les niches hématopoïétiques qui procurent aux cellules souches des facteurs de communication intercellulaire attractant (chimiokines telles SDF-1 se fixant sur CXCR4), des molécules d'adhésion (VLA-4) et des facteurs de croissance hématopoïétiques (interleukines 3, 6, SCF...). Les CSH vont se loger au contact des cellules des travées osseuses, principalement des ostéoblastes (pour revue voir (Blank et al., 2008) ou (Moore, 2004)) (Figure 4).



**Figure 4 : Niche des cellules souches hématopoïétiques (d'après (Blank et al., 2008)).**

Les CSH sont retrouvées à proximité des ostéoblastes au niveau de la surface endostéale de l'os. D'autres facteurs contribuant au microenvironnement des CSH sont présents comme la matrice extracellulaire (ECM), des cytokines et les autres cellules de la moelle osseuse.

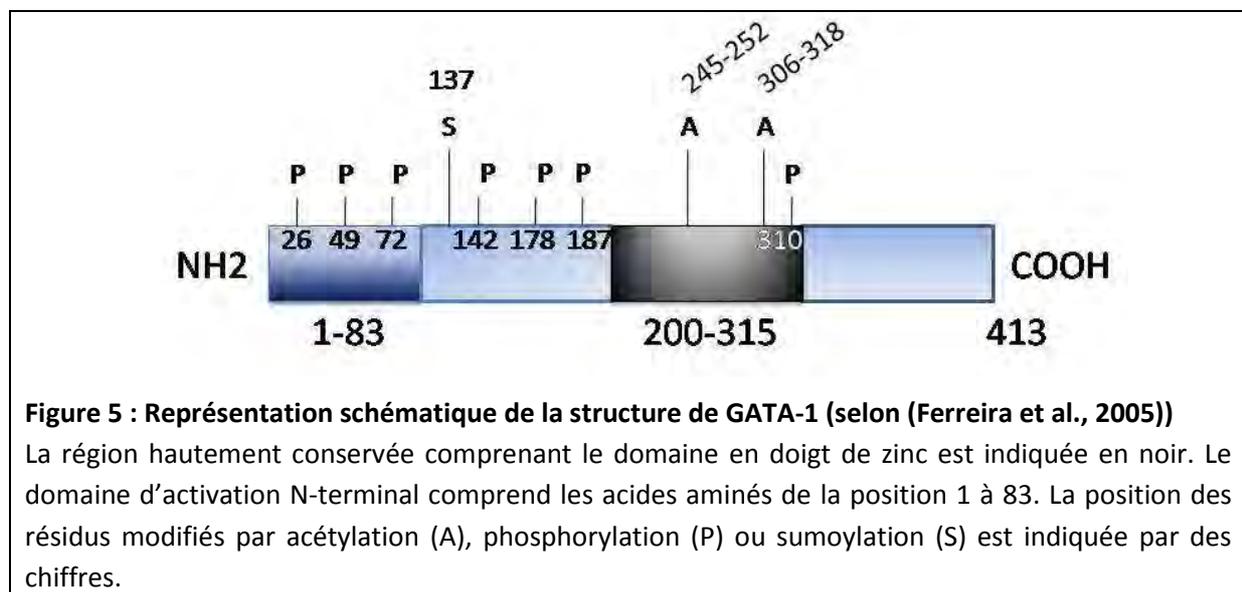
Dans certains cas de stress, l'érythropoïèse devient extra-médullaire. En effet, chez la souris adulte, l'érythropoïèse en condition d'homéostasie se déroule essentiellement dans la moelle osseuse. Cependant, lors d'un stress hypoxique pouvant être causé par une montée en altitude ou une anémie aiguë, l'augmentation des taux d'érythropoïétine circulants permet la mobilisation de cellules immatures de la moelle appelées CFU-S pour *Colony-Forming Units-Spleen* qui migrent dans la rate où elles prolifèrent et se différencient (McCulloch et al., 1964). Ces cellules donnent naissance à une population distincte de progéniteurs érythroblastiques appelés BFU-E de stress (BFU-Es) qui sont capables de former de larges colonies en 5 jours en milieu semi-solide. Ces colonies sont hypersensibles à l'Epo (Lenox et al., 2005). La protéine BMP4 semble être essentielle à la formation de ces progéniteurs. En cas d'anémie hémolytique, celle-ci est rapidement induite dans la rate et se lie sur les progéniteurs immatures via son récepteur Madh5 permettant ainsi la formation de progéniteurs de stress (Lenox et al., 2005). La génération de BFU-E de stress est de plus augmentée en situation d'hypoxie et en présence de SCF (Perry et al., 2007). Selon les auteurs, cette population serait probablement C-Kit<sup>+</sup>, CD71<sup>+</sup>, TER119<sup>+</sup>. Chez l'homme, l'érythropoïèse extra-médullaire peut être retrouvée lors de processus compensatoires d'une anémie chronique, plus particulièrement au cours de thalassémies, de drépanocytoses, ou de syndromes myéloprolifératifs comme la myélofibrose (Guermazi et al., 1999). La dysérythropoïèse provoque une anémie chronique ayant pour conséquence une stimulation de la production d'érythropoïétine. Les atteintes juxta-osseuses sont plus fréquentes dans les hémoglobinopathies et les anémies chroniques, alors que les lésions viscérales spléniques et hépatiques s'observent plus volontiers au cours des syndromes myéloprolifératifs. Dans tous les cas, l'érythropoïèse extra-médullaire est pathologique ne permet pas de compenser totalement le défaut de production médullaire des érythrocytes. En résumé, en

situation physiologique, les différents organes de l'érythropoïèse sont bien définis selon de stade de développement de l'individu et, hormis quelques cas pathologiques, la moelle osseuse est l'organe central du développement érythroïde chez l'adulte.

### 1.3 Engagement vers le lignage érythroïde : Rôle de GATA-1

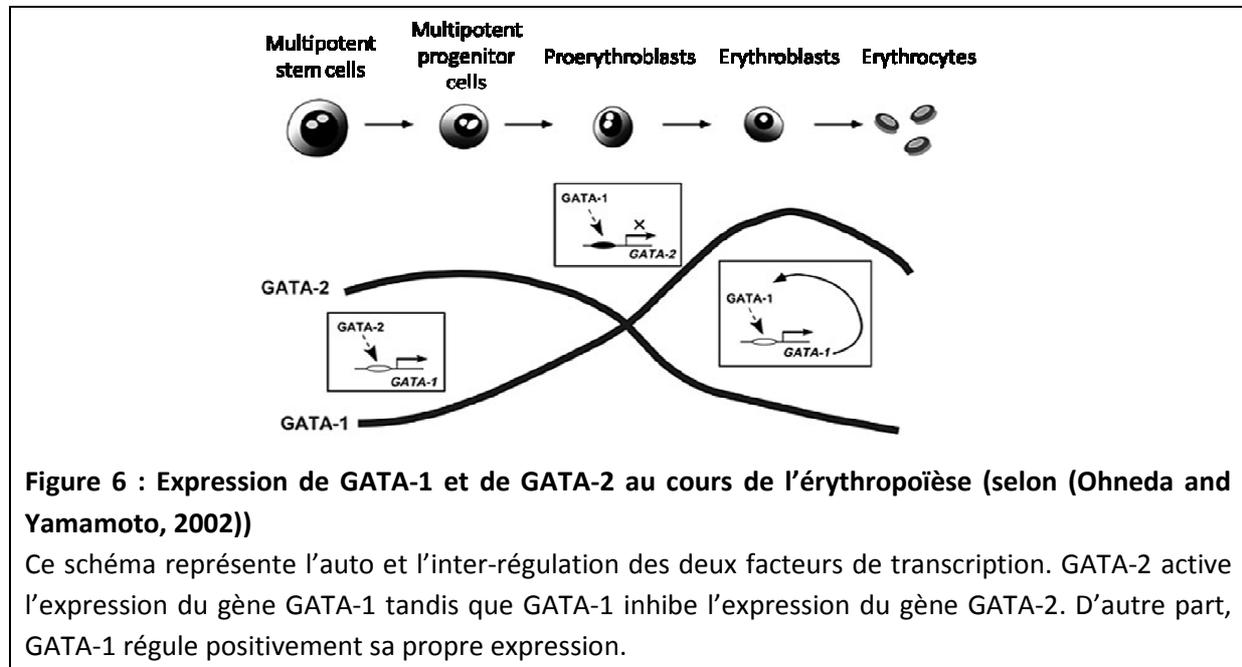
L'engagement des progéniteurs multipotents vers la voie érythroïde semble s'effectuer grâce à une combinaison d'expression de facteurs de transcription qui peuvent activer la transcription de gènes érythroïdes ou diminuer la transcription de gènes cibles spécifiques d'autres lignages.

Parmi eux, GATA-1 est le facteur indispensable à l'érythropoïèse (Arnold et al., 1985). GATA-1 fait partie de la famille des facteurs de transcription nommé GATA du fait de leur capacité à se lier aux motifs ((T/A)GATA(A/G)) situés sur les promoteurs cibles. Ce sont des facteurs de transcription à deux doigts de zinc : un doigt C-terminal nécessaire à la liaison de l'ADN et un doigt N-terminal nécessaire à l'interaction avec d'autres facteurs de transcription ou co-facteurs. La structure de GATA-1 est représentée figure 5



Parmi cette famille de 6 éléments, seuls GATA-1 et GATA-2 sont impliqués dans l'érythropoïèse ((Cantor and Orkin, 2002) pour revue). GATA-2 est nécessaire à l'érythropoïèse primitive. Les souris GATA-2<sup>-/-</sup> meurent *in utero* d'une réduction des cellules érythroïdes primitives (Tsai et al., 1994). Cependant, 15 à 50 % du nombre total d'érythrocytes primitifs sont retrouvés chez ces souris, suggérant que GATA-2 est nécessaire au début de l'hématopoïèse primitive, mais qu'il

peut être compensé à ce stade par d'autres facteurs de transcription ((Tsai et al., 1994) et pour revue (Ohneda and Yamamoto, 2002)). L'expression de GATA-2 diminue au cours de la différenciation érythroïde de façon concomitante à l'augmentation de l'expression de GATA-1. Il semblerait que GATA-2 soit réprimé par GATA-1 selon un mécanisme méconnu (Weiss et al., 1994) (Figure 6).



GATA-1 est absolument nécessaire dans les phases tardives de l'érythropoïèse puisqu'il régule, positivement et progressivement, l'expression des gènes érythroïdes comme les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des globines (Evans et al., 1988; Martin and Orkin, 1990), certaines enzymes à la synthèse de l'hème (Mignotte et al., 1989) et le récepteur de l'érythropoïétine (R-Epo) (Zon et al., 1991). D'autre part, GATA-1 permet la différenciation terminale en inhibant la progression du cycle au niveau de la phase G1/S (Rylski et al., 2003) et en diminuant l'expression de C-Kit (Munugalavadla et al., 2005).

Le gène de GATA-1 est situé sur le chromosome X ; les souris males invalidées pour ce gène meurent *in utero* au stade E10.5 à E12.5 de gestation, d'anémie sévère causé par un arrêt de maturation au stade proérythroblaste (Fujiwara et al., 1996; McDevitt et al., 1997; Takahashi et al., 1997). Des expériences effectuées sur des cellules souches embryonnaires (ES) invalidées pour le gène de GATA-1 ont montré que ces cellules n'arrivaient pas à atteindre le stade proérythroblaste et entraient rapidement en apoptose suggérant, outre son action pro-différenciante, le rôle essentiel de GATA-1 dans la survie des précurseurs érythroïdes (Weiss et al., 1994). Cette activité anti-apoptotique semble passer par la régulation positive de la protéine Bcl-XL (Gregory et al., 1999).

L'activité de GATA-1 est finement régulée durant l'érythropoïèse au niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. Son expression augmente progressivement lors de la

différenciation. En effet, GATA-1 se fixe à son propre promoteur et au niveau de sa séquence activatrice ou *enhancer* régulant ainsi positivement sa transcription (Nishimura et al., 2000). La dégradation de GATA-1 semble nécessaire à la différenciation terminale puisque la surexpression de GATA-1 bloque la différenciation de cellules érythroïdes (Whyatt et al., 2000). Plusieurs mécanismes de dégradation ont été décrits. Tout d'abord, GATA-1 est un substrat de la caspase-3 qui est activée soit en fin de différenciation (Zermati et al., 2001), soit par l'activation de Fas sur les érythroblastes immatures en condition sous-optimale d'Epo (De Maria et al., 1999). Une étude du laboratoire a montré qu'en fin de différenciation et en présence d'Epo, la protéine chaperonne Hsp70 s'associe à GATA-1 dans le noyau, le protégeant ainsi du clivage par la caspase-3. En absence d'Epo, il y a export nucléaire d'Hsp70 et clivage de GATA-1 (Ribeil et al., 2007) voir papier en annexe). D'autre part, GATA-1 peut aussi être dégradé par la voie du protéasome après acétylation puis phosphorylation (Hernandez-Hernandez et al., 2006).

GATA-1 participe à la régulation de l'érythropoïèse par de nombreuses interactions protéiques avec des molécules de régulation épigénétique de la structure chromatinienne telles que l'histone acetylase CBP (Letting et al., 2004), et avec d'autres facteurs de transcription impliqués dans l'érythropoïèse tels que le facteur érythroïde Krüppel-like factor (EKLF) ou, de façon plus spécifique, son cofacteur FOG-1 (Tsang et al., 1997). Enfin, GATA-1 a un effet antagoniste avec le facteur de transcription PU-1 nécessaire au développement des lignages lymphoïdes et granulo-monocytaires. Cet effet répressur est nécessaire au bon déroulement de l'érythropoïèse puisque, dans un modèle d'érythroleucémie murine, la surexpression de PU-1 est oncogénique (Moreau-Gachelin et al., 1988). D'autre part, l'acquisition de mutations activatrices sur le récepteur à activité tyrosine kinase C-Kit permet le développement de la maladie (Kosmider et al., 2005). Néanmoins, il n'est pas prouvé que ce mécanisme de leucémiogénèse à deux étapes soit retrouvé dans les érythroleucémies humaines ((Coulon et al., 2007), papier en annexe). En résumé, GATA-1 est le facteur de transcription absolument indispensable à l'érythropoïèse puisqu'il permet la survie et la maturation des érythroblastes.

## 2 Régulation positive de l'érythropoïèse

L'érythropoïèse est un système finement régulé à différents niveaux afin de produire un nombre de globules rouges adapté aux situations normales et pathologiques. En effet, on considère qu'à l'état basal 250 milliards d'érythroblastes sont présents dans la moelle, 25 000 milliards de globules rouges circulent en permanence, ainsi que 50 milliards de réticulocytes. La production des

érythrocytes représente le plus haut rendement du système hématopoïétique, avec un taux de production estimé à 200 milliards d'érythrocytes par jour, production qui peut augmenter plus de sept fois en cas de besoin. Afin de maintenir un taux de globules rouges adapté aux différentes conditions physiopathologiques, il existe une fine régulation de l'érythropoïèse au niveau cellulaire et moléculaire. L'érythropoïèse est régulée positivement principalement par l'action de deux facteurs de croissance, l'érythropoïétine et le SCF qui agissent respectivement selon un mode endocrine et paracrine. Ces deux cytokines sont absolument essentielles à l'érythropoïèse et leur structure, la cinétique d'expression de leur récepteur ainsi que les mécanismes de coopération, seront détaillés ci-dessous. D'autre part, l'érythropoïèse est régulée négativement mais cet aspect de régulation ne sera pas détaillé dans cette thèse.

## **2.1 Régulation endocrine par l'érythropoïétine**

De nombreuses hormones interviennent dans la régulation endocrine de l'érythropoïèse. Parmi celles-ci, on peut citer l'insuline-like growth factor-1 (IGF-1) (pour revue voir (Shimon and Shpilberg, 1995)), les hormones cortico-surréaliennes (androgènes et glucocorticoïdes (Malgor et al., 1998; Wessely et al., 1997), les hormones thyroïdiennes ou rénales (système rénine/angiotensine)(Bauer et al., 1998; Cole et al., 2000). Ces hormones exercent de façon générale une action positive sur l'érythropoïèse en favorisant la prolifération des progéniteurs et pour certaines en favorisant la différenciation terminale. Elles ne sont cependant pas indispensables au bon déroulement de l'érythropoïèse, contrairement à l'érythropoïétine (Epo) produite par le rein et régulée par l'oxygénation tissulaire qui est l'acteur principal de la régulation érythroïde.

### **2.1.1 Structure de l'Epo**

L'Epo est le premier facteur de croissance hématopoïétique à avoir été isolé en 1977 (Miyake et al., 1977) avant d'être cloné en 1985. Cette glycoprotéine de 34 kDa est composée de 165 acides aminés, 3 N-glycanes et un O-glycane (pour revue voir (Krantz, 1991)). Les N-glycanes, ancrés au niveau de résidus asparagine (position 24, 38 et 83) jouent un rôle essentiel dans la demi-vie de la protéine et dans l'affinité pour son récepteur. Il est à noter que de nombreuses isoformes d'Epo sont retrouvées dans le plasma, présentant des différences de glycosylation et d'activité biologique.

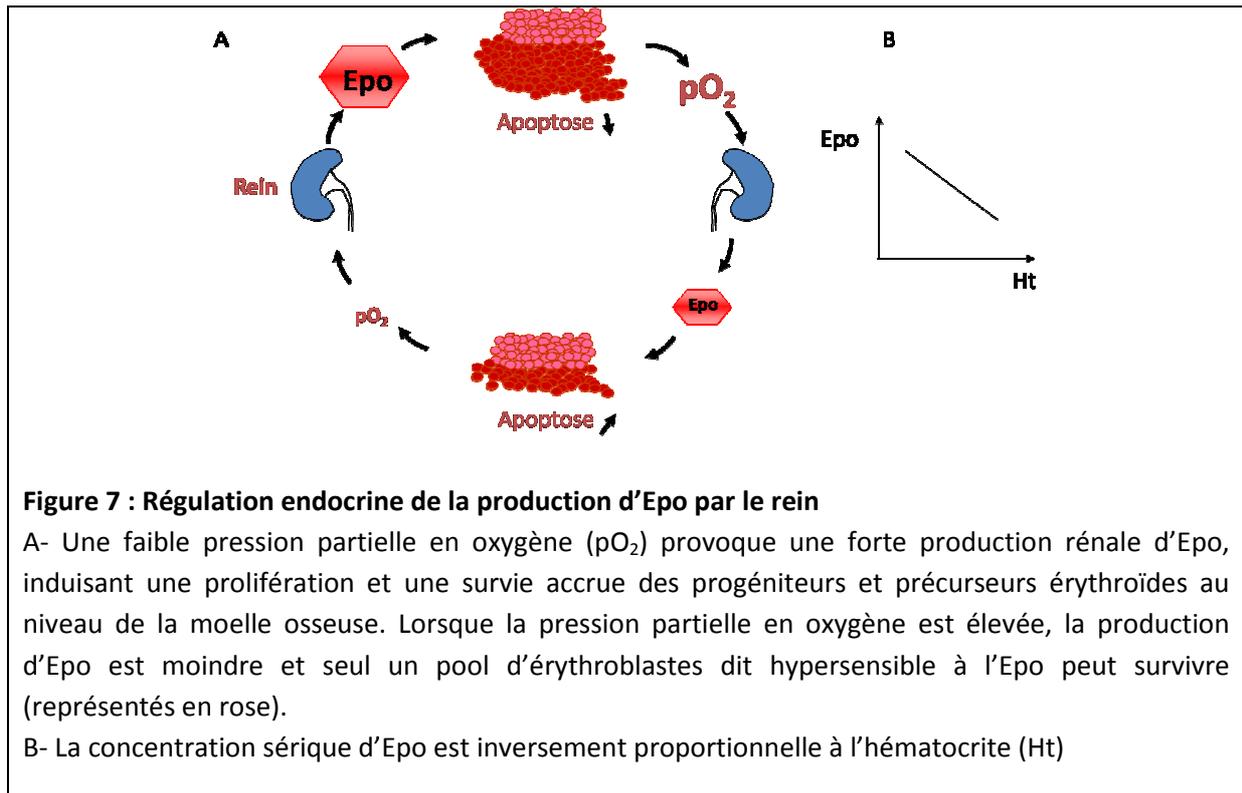
L'érythropoïétine recombinante humaine (rHuEpo), synthétisée dès 1986, a permis de grandes avancées tant dans la prise en charge thérapeutique des patients anémiques, que dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'érythropoïèse. La rHuEpo classique (époétine- $\alpha$  et époétine- $\beta$ ) possède les mêmes sites de glycosylation que l'Epo physiologique. Par la suite, les chimistes ont tenté de modifier la molécule en créant deux sites de glycosylation supplémentaires dans le but d'augmenter la demi-vie plasmatique de la protéine. Ainsi, la darbepoietine- $\alpha$  a une demi-vie 3 à 4 fois plus longue que les précédentes, ce qui permet d'espacer les injections chez le patient.

### **2.1.2 *Lieu de Production***

L'Epo est produite au niveau du rein par les fibroblastes de la jonction cortico-médullaire. En situation d'hypoxie, les fibroblastes producteurs sont progressivement recrutés au niveau de la corticale et de la médullaire externe (Koury et al., 1989; Maxwell et al., 1993). L'Epo peut également être produite en moindre mesure dans le foie par les hépatocytes et les cellules de Ito (Maxwell et al., 1994). Cependant, en cas de défaillance rénale, la production hépatique est insuffisante pour le maintien d'un hématoците normal (Caro et al., 1979). De plus, de l'ARNm de l'Epo a été retrouvé dans le cerveau, le placenta, la rétine et les testicules (Tan et al., 1992).

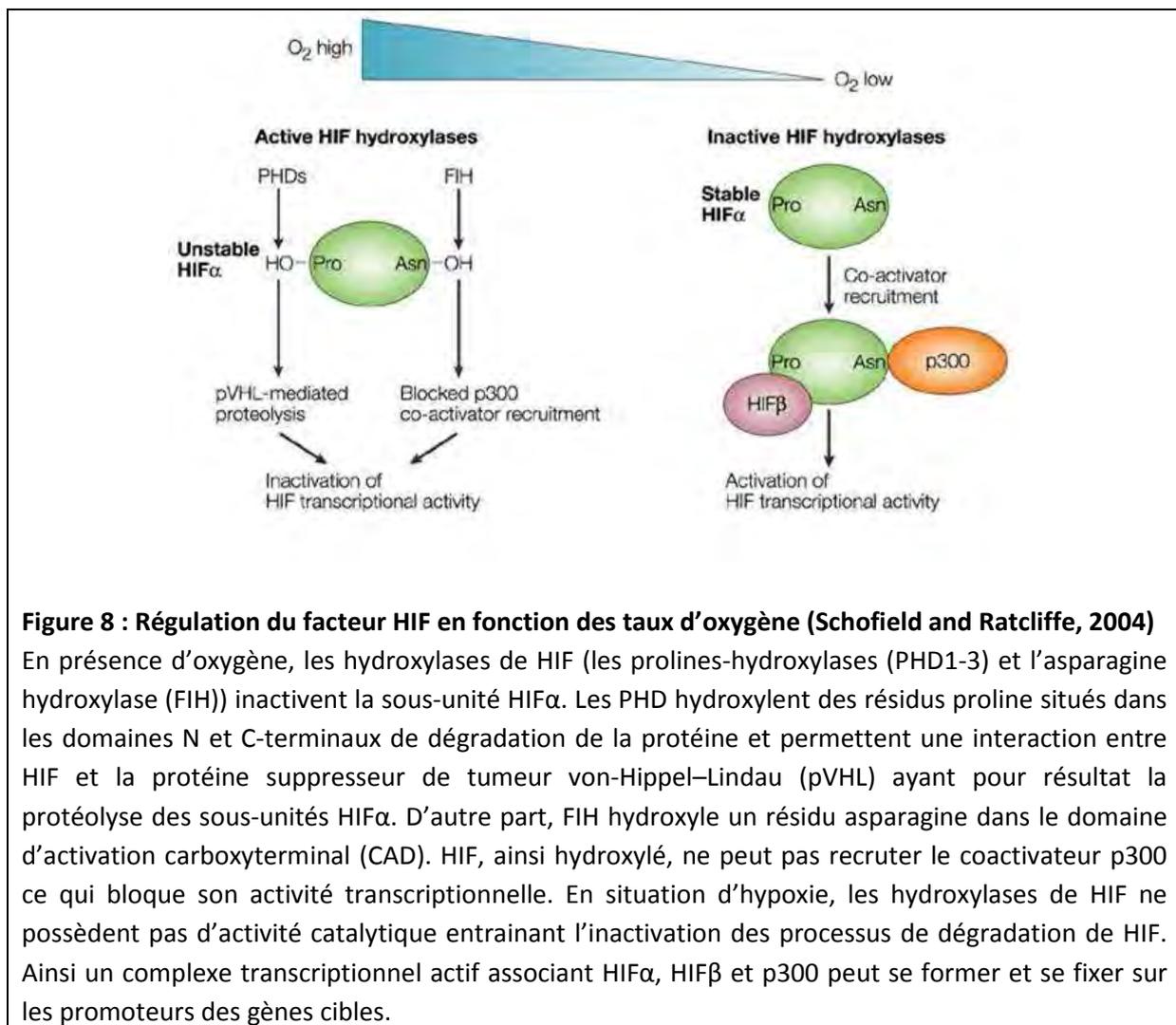
### **2.1.3 *Régulation de la production***

L'érythropoïétine est, avec la thrombopoïétine (TPO), une des rares cytokines à se comporter comme une hormone. En effet, celle-ci est produite essentiellement par le rein et va agir au niveau de la moelle osseuse (Reissmann, 1950). La synthèse rénale de l'Epo est finement régulée de façon à ce que le nombre de globules rouges produits soit en adéquation avec les besoins en oxygène des tissus périphériques. En effet, un nombre élevé d'érythrocytes augmente l'apport en oxygène des cellules rénales qui vont alors diminuer leur synthèse d'Epo ce qui, en retour, aura pour conséquence une diminution de la production de globules rouges. Il existe donc à ce niveau une véritable régulation endocrine, le rein étant la «glande» productrice et la moelle osseuse l'organe cible (Figure 7).



La production de l'Epo est régulée de façon transcriptionnelle par la présence d'un *enhancer* en 3' du gène à environ 120 bases avant le signal de polyadénylation, qui est la cible du facteur de transcription HIF (*Hypoxia Inductible Factor*). HIF, cloné en 1995 (Wang et al., 1995), est un dimère constitué de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . La sous-unité  $\beta$  (aussi appelée ARNT) est exprimée constitutivement tandis que l'expression de la sous-unité  $\alpha$  est régulée selon le niveau d'oxygène. Il existe trois protéines HIF  $\alpha$  dont les gènes sont situés sur des locus distincts. HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  ont la même structure et sont régulées de façon identique, tandis que la fonction et la régulation de HIF-3 $\alpha$  est, à l'heure actuelle, moins comprise. L'activité de HIF-1 $\alpha$  (ou HIF-2 $\alpha$ ) est régulée selon deux mécanismes post-transcriptionnels distincts (Figure 8). En situation de normoxie, HIF-1 $\alpha$  est hydroxylée sur deux résidus proline (P402 et P564), ce qui permet sa liaison à la protéine suppresseur de tumeur Von Hippel Lindau (pVHL). pVHL est une E-3 ligase qui va permettre l'ubiquitination de HIF-1 et la dégradation du complexe ainsi formé par le protéasome. L'hydroxylation des résidus proline de HIF-1 $\alpha$  est effectuée par trois proline-hydroxylases (PHD1-3) dont l'activité est réduite en condition de faible oxygénation. C'est pourquoi, en situation d'hypoxie, HIF-1 $\alpha$  faiblement hydroxylée échappe à la dégradation par le protéasome médiée par pVHL, et se lie à HIF1-  $\beta$  permettant sa fixation à la séquence *enhancer* du gène de l'Epo. D'autre part, l'activité transcriptionnelle de HIF est dépendante de deux co-activateurs CBP et p300 (Arany et al., 1996). La liaison de HIF-1 $\alpha$  avec p300 est bloquée lorsque HIF-1 $\alpha$  est hydroxylé sur un résidu asparagine

(A803). Cette réaction est catalysée par une asparagine hydroxylase nommée FIH (*factor inhibiting HIF*) qui, bien que de séquence différente des prolines hydroxylases (PHD1-3), possède aussi une activité oxygène-dépendante (Lando et al., 2002). Ainsi, il existe un deuxième niveau de régulation dépendant de l'oxygénation permettant d'inhiber l'activité de HIF-1 $\alpha$  ayant échappé à la dégradation par le protéasome (Figure 8). Il est à noter que le complexe HIF a de nombreuses autres cibles que le gène de l'Epo, puisqu'il peut se lier sur les HRE (*Hypoxia Responsive Element*) de nombreux gènes impliqués, entre autres, dans l'angiogénèse (VEGF, EGF..), le métabolisme du fer (la transferrine (Lando et al., 2002), le récepteur de la transferrine (RTF1))(Tacchini et al., 1999) et le métabolisme énergétique (glucose transporter 1, glyceraldehyde phosphate hydrogenase (Iyer et al., 1998)).



**Figure 8 : Régulation du facteur HIF en fonction des taux d'oxygène (Schofield and Ratcliffe, 2004)**

En présence d'oxygène, les hydroxylases de HIF (les prolines-hydroxylases (PHD1-3) et l'asparagine hydroxylase (FIH)) inactivent la sous-unité HIF $\alpha$ . Les PHD hydroxylent des résidus proline situés dans les domaines N et C-terminaux de dégradation de la protéine et permettent une interaction entre HIF et la protéine suppresseur de tumeur von-Hippel-Lindau (pVHL) ayant pour résultat la protéolyse des sous-unités HIF $\alpha$ . D'autre part, FIH hydroxyle un résidu asparagine dans le domaine d'activation carboxyterminal (CAD). HIF, ainsi hydroxylé, ne peut pas recruter le coactivateur p300 ce qui bloque son activité transcriptionnelle. En situation d'hypoxie, les hydroxylases de HIF ne possèdent pas d'activité catalytique entraînant l'inactivation des processus de dégradation de HIF. Ainsi un complexe transcriptionnel actif associant HIF $\alpha$ , HIF $\beta$  et p300 peut se former et se fixer sur les promoteurs des gènes cibles.

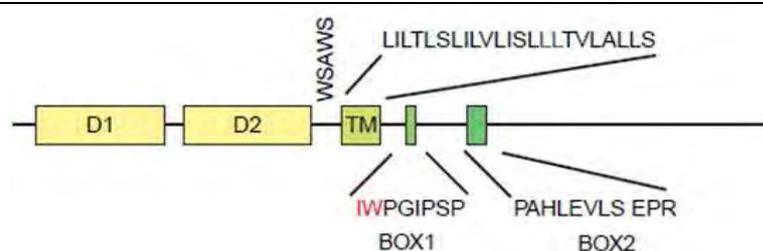
D'autre part, la production d'Epo est régulée positivement par la privation en fer. En effet, la privation en fer permet la fixation du complexe HIF sur l'*enhancer* de l'Epo car les enzymes

hydroxylant HIF ont une activité catalytique dépendante du fer (pour revue (Schofield and Ratcliffe, 2004)). D'autres métaux, incluant le cobalt, le nickel et le manganèse, semblent aussi avoir un effet positif sur la production de l'Epo selon un mécanisme similaire à la privation en fer.

## 2.1.4 Le R-Epo

### 2.1.4.1 Structure

Le récepteur de l'érythropoïétine ou R-Epo est une protéine constituée de 507 acides aminés appartenant à la super-famille des récepteurs aux cytokines de type 1. Le domaine extracellulaire du R-Epo possède deux domaines nommés D1 et D2 (Livnah et al., 1996), l'un nécessaire à la dimérisation du récepteur et l'autre jouant un rôle dans la liaison au ligand et la transduction du signal. Le domaine transmembranaire contient deux résidus leucine essentiels à la dimérisation du récepteur et la transduction du signal (Kubatzy et al., 2001) et le domaine intracellulaire possède deux séquences conservées, nommées Box1 et Box2 (Figure 9).



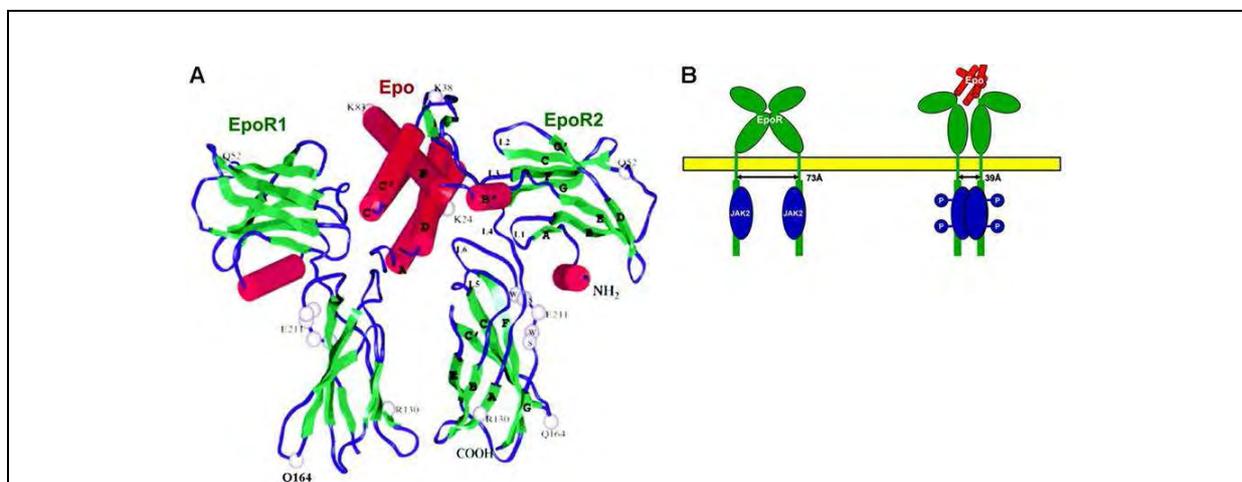
**Figure 9 : Domaines structuraux du récepteur de l'érythropoïétine (selon (Richmond et al., 2005))**

Le domaine extra-cellulaire du R-Epo est constitué de deux domaines fibronectines de type 2 D1 (résidus 11 à 113) et D2 (résidus 118 à 218). Chaque sous-domaine possède deux résidus cystéines qui permettent la formation d'un pont disulfure intra-domaine. Le domaine transmembranaire contient deux leucines (position 240 et 241) qui sont essentielles à l'activation du récepteur. Le domaine juxta-membranaire est rigide et contient des motifs hydrophobiques. La partie intracytoplasmique comprend deux régions Box1 (résidus 257-264) et Box 2 (résidus 302-312). Plusieurs résidus entre la partie juxta-membranaire et la Box1 sont importants pour l'activation de JAK2 par le récepteur de l'Epo. Parmi ceux-ci l'isoleucine (I257) et la tryptophane (W258) sont indiqués en rouge.

Le R-Epo est dénué de toute activité tyrosine kinase intrinsèque. C'est pourquoi, celui-ci a besoin de l'ancrage au niveau du domaine D1 de la tyrosine kinase JAK2 qui est le pivot central de la signalisation de l'Epo. En absence de son ligand, le R-Epo est présent à la surface cellulaire sous

forme de dimère inactif. Sa liaison à l'Epo induit un changement conformationnel du récepteur au niveau des domaines D1 et D2 et permet la transphosphorylation de chaque protéine JAK2 présente au niveau de chaque monomère (Pour revue voir (Richmond et al., 2005)) (Figure 10).

Ainsi, la kinase JAK2 joue un rôle majeur dans la transduction du signal consécutif à la liaison de l'Epo sur son récepteur. D'ailleurs, les souris invalidées pour JAK2 ont un phénotype quasi identique aux souris invalidées pour l'Epo et R-Epo (Neubauer et al., 1998; Parganas et al., 1998). JAK2 possède, comme tous les membres de la famille de JAK, sept domaines *JAK-homology* (JH) localisés au niveau C-terminal dont un domaine catalytique (JH1) à activité tyrosine kinase et un domaine pseudo-kinase (JH2). Le domaine pseudo-kinase possède une structure similaire au domaine tyrosine kinase jouant probablement un rôle de rétrocontrôle négatif (Lindauer et al., 2001; Saharinen et al., 2000). En conditions physiologiques, l'activation de JAK2 permet la phosphorylation du R-Epo sur ses résidus tyrosines intracellulaires. Au moins 8 résidus tyrosines semblent impliqués dans l'activation du R-Epo et contribuent à l'activation de divers relais intracellulaires. Cependant, de façon surprenante et contrairement à JAK2, ces résidus ne sont pas indispensables à l'activation des voies de signalisation car les souris *knock-in* (KI) pour un R-Epo tronqué de tous ses résidus tyrosine sont viables (Zang et al., 2001). Il semble pourtant que l'intensité du signal généré par un récepteur invalidé pour les résidus tyrosine soit beaucoup plus faible, puisque la réponse au stress des souris KI est altérée (Li et al., 2003a).



**Figure 10 : Liaison de l'Epo à son récepteur homodimérique et initiation de la transduction du signal (Bunn, 2007)**

A- Structure cristallisée du complexe formé par l'Epo et les deux domaines extracellulaires de l'Epo-R (Syed et al., 1998). Les cylindres rouges représentent les structures en hélice  $\alpha$  et les rubans verts les feuillets  $\beta$ .

B- Représentation schématique du changement conformationnel du R-Epo lors de sa liaison à l'Epo. La proximité des deux domaines intracytoplasmiques permet l'autophosphorylation de JAK2 et l'initiation de la transduction du signal.

#### 2.1.4.2 Expression

Le R-Epo est exprimé faiblement sur les progéniteurs érythroïdes immatures puis fortement à partir du stade BFU-E mature et CFU-E. En dehors de l'érythropoïèse, le R-Epo est exprimé sur les progéniteurs mégacaryocytaires et les mégacaryocytes (Ishibashi et al., 1987) soulignant la communauté entre ces deux lignées (McDonald and Sullivan, 1993). Les souris invalidées pour le gène du *R-Epo* meurent au stade embryonnaire (E13 à E15) d'anémie profonde causée par une accumulation des progéniteurs au stade BFU-E et CFU-E (Wu et al., 1995b). Ainsi, la liaison de l'Epo à son récepteur n'est pas nécessaire à l'engagement vers la voie érythroïde mais indispensable à l'érythropoïèse tardive. Des transcrits du R-Epo ont aussi été retrouvés dans d'autres tissus non hématopoïétique comme les épithéliums mammaires et intestinaux, le placenta, les cellules musculaires ou endothéliales (Anagnostou et al., 1994; Masuda et al., 1999). De nombreux travaux ont étudié l'implication du R-Epo au niveau du système nerveux central et du myocarde (Csete et al., 2004; Calvillo et al., 2003; Juul, 2004). En effet, les souris R-Epo<sup>-/-</sup> présentent, en plus de leur anémie, des malformations cardiaques (Wu et al., 1999) et des anomalies cérébrales (Yu et al., 2002). De plus, l'administration d'Epo confère un rôle neuro ou cardio-protecteur après ischémie cérébrale ou myocardique (Brines et al., 2000; Calvillo et al., 2003). Cependant, il est à noter que les souris R-Epo<sup>-/-</sup> exprimant le R-Epo uniquement dans la lignée érythroïde sont viables et présentent un phénotype normal (Suzuki et al., 2002), ce qui laisse penser que le R-Epo n'est indispensable qu'aux érythroblastes. Enfin, le R-Epo a été impliqué dans la croissance et la progression de certains cancers. L'expression du R-Epo a été retrouvée sur de nombreuses tumeurs (sein, poumon, col de l'utérus), et certaines études ont montré que celui-ci était fonctionnel (Arcasoy et al., 2002). Ces constatations ont fait l'objet de vives polémiques car l'utilisation d'érythropoïétine recombinante (rHuEpo) est préconisée dans la prise en charge de l'anémie en oncologie. En outre, plusieurs essais cliniques ont montré l'effet délétère de celle-ci sur la progression et la survie des patients inclus (Leyland-Jones et al., 2005). Un essai clinique prospectif en double aveugle, publié en 2006 chez des patients atteints de cancers de la tête et du cou, a montré un nombre de rechutes plus important dans le bras rHuEpo (Henke et al., 2006). De façon intéressante, la majorité des patients ayant rechuté présentait un marquage par immunohistochimie (IHC) positif pour le R-Epo sur des coupes de leur tumeur. Cependant, ces études ne permettent pas de conclure formellement sur le rôle du R-Epo en cancérologie du fait, entre autres, de biais de sélection des patients et du taux cible d'hémoglobine trop élevé. De plus, une équipe a récemment mis en évidence une réaction croisée des anticorps anti-R-Epo utilisés en IHC avec la protéine de choc thermique HSP-70 qui peut être surexprimée dans les cellules tumorales (Elliott et al., 2006). Ainsi, la balance bénéfique/risque de

l'administration de rHuEpo chez les patients atteints de cancer reste encore à déterminer. Concernant la physiopathologie de la lignée érythroïde, des mutations activatrices du R-Epo ont été mises en cause dans de rares cas de polyglobulies familiales (Sokol et al., 1995) et ont pu provoquer l'induction d'érythroleucémies murines (Longmore and Lodish, 1991). Néanmoins, des mutations de la protéine JAK2 sont en causes dans la plupart des pathologies où sont retrouvées une prolifération anormale d'érythroblastes ou une insensibilité aux taux d'Epo. En effet, la majorité des patients atteints de polyglobulie de Vaquez (PV) présentent une mutation au niveau du domaine pseudo-kinase de JAK2 (V617F) qui semble inactiver la boucle de rétrocontrôle négatif, permettant ainsi une phosphorylation constitutive de la tyrosine Y1007 et l'activation permanente des voies de signalisation (James et al., 2005) et pour revue (Staerk et al., 2007).

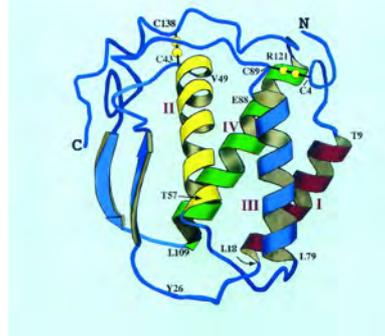
## 2.2 Régulation paracrine par le Stem Cell Factor

L'érythropoïèse peut être régulée selon un mode paracrine et autocrine par l'intermédiaire de nombreuses cytokines. Ces cytokines sont synthétisées au niveau du stroma médullaire par les fibroblastes, les adipocytes, les cellules endothéliales mais aussi par les cellules hématopoïétiques, notamment les lymphocytes, les monocytes et les macrophages des îlots érythroblastiques. Les interleukines IL-3, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11 et le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) participent toutes à la régulation positive de l'érythropoïèse en activant des signaux de prolifération et de survie cellulaire (Birkmann et al., 1997). Cependant, aucun de ces facteurs n'est critique pour le développement de la lignée érythroïde *in vivo*. Le SCF est, parmi les facteurs sécrétés de façon paracrine, l'unique cytokine indispensable à l'érythropoïèse précoce car celui-ci envoie des signaux de prolifération et de survie cellulaire, tout en retardant la maturation terminale des érythroblastes favorisant ainsi la prolifération des éléments immatures.

### 2.2.1 SCF

Le SCF est une protéine dimérique glycosylée dont la structure présente de fortes homologies avec le M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) (pour revue voir (Broudy, 1997))(Figure 11). Cette cytokine existe sous deux formes distinctes du fait d'un épissage alternatif au niveau l'exon 6, sur lequel se situe un site de clivage protéolytique (Flanagan et al., 1991). Ainsi, la protéine exprimant le site de clivage est soluble tandis que l'autre est transmembranaire. Les deux

formes sont biologiquement actives mais la forme transmembranaire semble être primordiale dans la régulation positive de l'érythropoïèse. En effet, les souris n'exprimant que la forme soluble (mutation  $S^d$ ) sont viables mais présentent une sévère anémie macrocytaire (Brannan et al., 1991; Flanagan et al., 1991; Russell, 1979). Ce phénotype peut être expliqué par le fait que la forme soluble active le C-Kit de façon plus transitoire que la forme transmembranaire et entraîne une internalisation plus rapide du récepteur aboutissant à sa dégradation (Miyazawa et al., 1995).



**Figure 11 : Représentation schématique de la structure du SCF**

Le SCF est constitué de quatre hélices  $\alpha$  et deux feuillets  $\beta$ . Les ponts disulfures sont représentés par des points jaunes.

Le SCF agit en synergie avec d'autres cytokines comme l'IL-3, le G-CSF et le GM-CSF sur la croissance des CFU-GEMM, CFU-GM et BFU-E, en induisant des signaux de survie et de prolifération. De plus, le SCF ralentit la différenciation des érythroblastes les plus matures (Muta et al., 1995). A partir du stade CFU-E, le SCF agit en synergie avec l'Epo afin d'empêcher l'apoptose et permettre la prolifération (voir chapitre « coopération C-Kit/Epo ci-dessus »). Enfin, il a été montré que le SCF empêche l'apoptose induite par Fas des progéniteurs (Lee et al., 1997) probablement par inhibition de l'activation des caspases-3 et 8 (Nishio et al., 2001). Le SCF semble jouer aussi un rôle important dans l'adhésion des cellules aux molécules de la matrice extra-cellulaire comme la fibronectine. Cette action serait due à des modulations du nombre de protéines de surface VLA-4 ou VLA-5 sur les précurseurs hématopoïétiques (Levesque et al., 1995). Une autre hypothèse est que la liaison même du SCF transmembranaire sur le C-Kit permettrait le rapprochement des cellules hématopoïétiques de l'environnement médullaire (Flanagan et al., 1991).

Les cellules stromales produisent le SCF de façon probablement constitutive (Broudy, 1997). Les concentrations de SCF dans la circulation, contrairement à l'Epo, ne sont pas inversement liées à l'hématocrite (Abkowitz et al., 1996) et ne semblent pas varier en situation d'hypoxie ou de polyglobulie. Il est probable, bien que non formellement démontré, que le taux de SCF disponible soit dépendant du taux de consommation de SCF par son récepteur et donc aussi du niveau

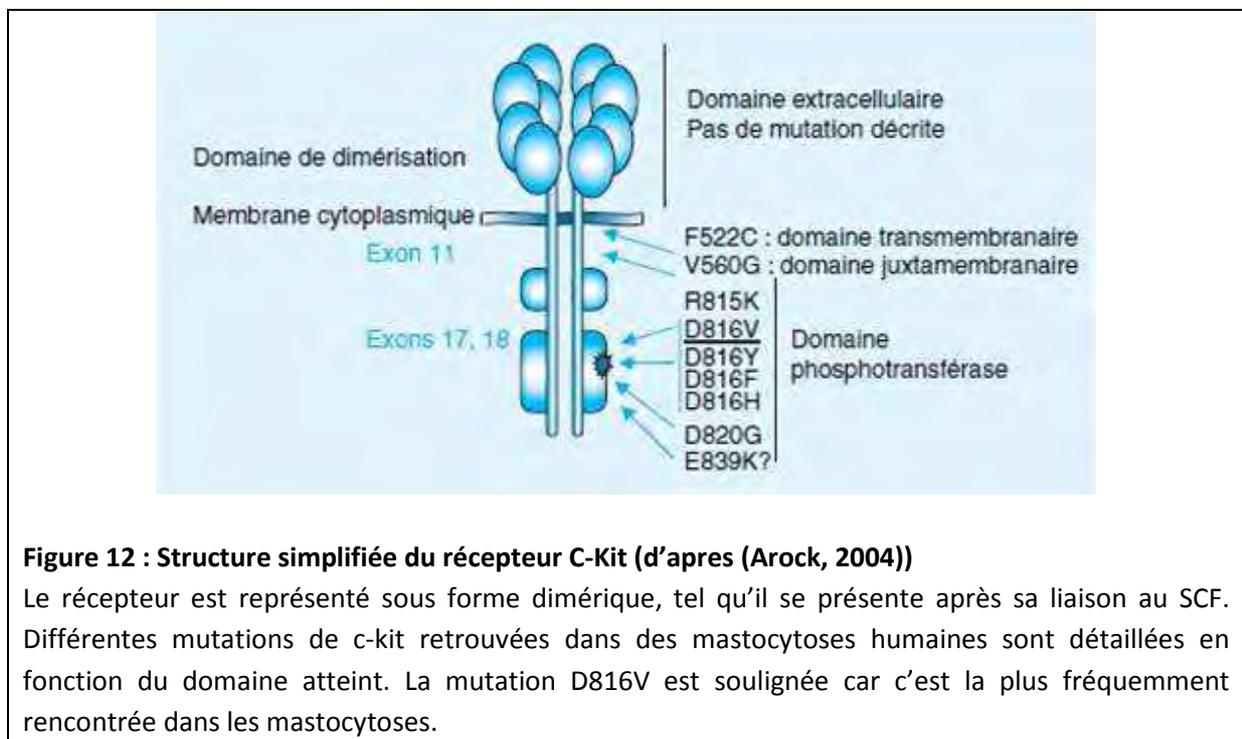
d'expression de celui-ci à la surface des précurseurs érythroïdes. L'injection de SCF recombinant a été évaluée en thérapeutique, mais l'utilisation de celui-ci est limitée du fait d'importants effets indésirables causés par la dégranulation des mastocytes au niveau du site d'injection (Costa et al., 1996; Weaver et al., 1996). Cet effet étant dose dépendant, l'adjonction de faibles doses de SCF à d'autres cytokines comme le G-CSF a été testée avec succès dans la mobilisation dans le sang périphérique de cellules souches chez des patients présentant un syndrome lymphoprolifératif (Herbert et al., 2009).

### **2.2.2 C-Kit**

Le récepteur au SCF, nommé C-Kit, fait partie de la famille des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase de type 3 au même titre que le CSF-1 et le PDGF (Ullrich and Schlessinger, 1990). Ce récepteur est exprimé sur les progéniteurs hématopoïétiques, les mastocytes, les mélanocytes, les cellules germinales et les cellules interstitielles de Cajal (McNiece and Briddell, 1995). Il est composé de 5 domaines immunoglobulines extracellulaires, un domaine kinase 1 juxtamembranaire (site de liaison de l'ATP), et un domaine kinase 2 (site de l'activité phosphotransférase). De façon physiologique, le récepteur C-Kit se dimérise et s'autophosphoryle lors de sa liaison au SCF et active des molécules de transduction du signal comme la phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ; liaison sur tyrosine 728) (Gommerman et al., 2000), la sous-unité p85 de la PI-3K (résidu tyrosine 719) (Serve et al., 1995), les kinases de la famille Src (liaison sur tyrosine 568/569) (Linnekin et al., 1997), Grb2 (tyrosine 702) et Grb7 (tyrosine 934) (Thommes et al., 1999). Les conséquences de l'activation de ces voies seront détaillées dans le chapitre « activation des voies de signalisation » ci-dessous. Il existe aussi une régulation négative de C-Kit médiée par de nombreuses phosphatases, notamment SHP-1, SHP-2 et SHIP (SH2-containing inositol phosphatase). Brièvement, au niveau des mastocytes et lors de leur dégranulation, SHP-1 régule négativement le C-Kit en le dé-phosphorylant (Huber et al., 1998), alors que SHP-2 influence l'activation de la voie MAPK.

L'importance de l'interaction entre le C-Kit et le SCF dans le développement du lignage érythroïde a été mise en évidence dans des études des souris mutantes sur les *locii* *White spotting* (W) ou *Steel* (S) correspondant respectivement aux gènes du C-Kit (Chabot et al., 1988; Geissler et al., 1988) et du SCF (Huang et al., 1990; Zsebo et al., 1990). Pour ces deux *locii*, de nombreux allèles ont été identifiés. De nombreuses mutations indépendantes sont décrites sur le locus W ; ce sont des mutations semi-dominantes qui entraînent des phénotypes communs plus ou moins marqués selon l'allèle touché et l'état d'homozygotie ou d'hétérozygotie de la souris (anémie, infertilité, dépigmentation). Chez

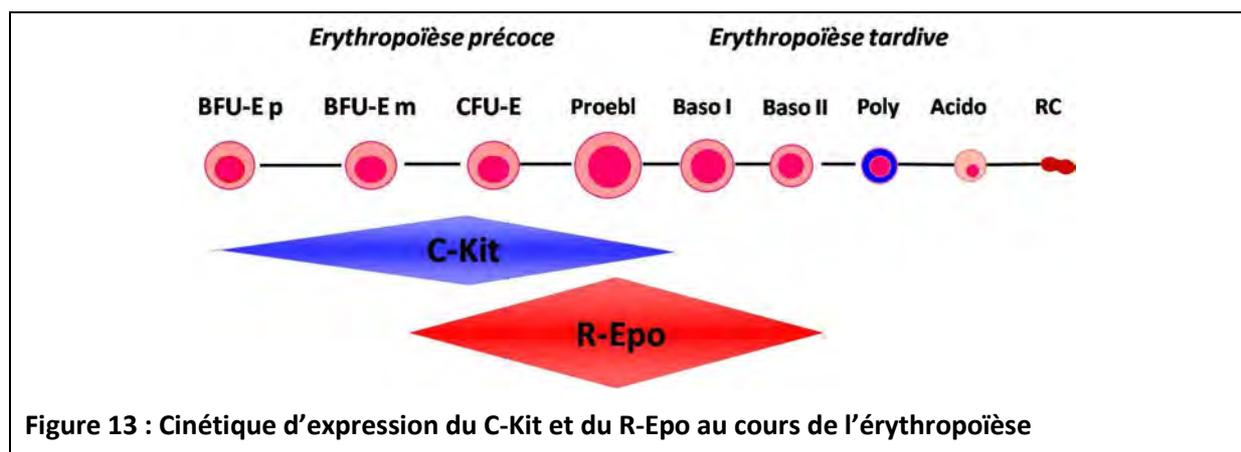
l'homme, une trentaine de mutations ponctuelles acquises et activatrice de C-Kit sont décrites et jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de certaines maladies comme la mastocytose ou les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) (Akin and Metcalfe, 2004) (Figure 12). En effet, la mutation D816V sur le site catalytique du récepteur est détectée chez environ 70% des adultes atteints d'une mastocytose systémique et permet l'activation constitutive du récepteur sans ligand ni dimérisation. Cette mutation est de mauvais pronostic car elle confère une résistance à l'inhibiteur de tyrosine kinase imatinib Glivec® classiquement utilisé dans ces pathologies (Heinrich et al., 2002). Concernant les GIST, la principale mutation impliquée est retrouvée essentiellement dans le domaine juxta-membranaire (V560G) et permet la dimérisation du récepteur sans son ligand. Les patients ayant cette mutation sont sensibles à l'imatinib. Les mutations inactivatrices chez l'Homme ne sont, par contre, pas décrites car probablement létales *in utero*.



### 2.3 Mécanismes de coopération entre le C-Kit et le R-Epo

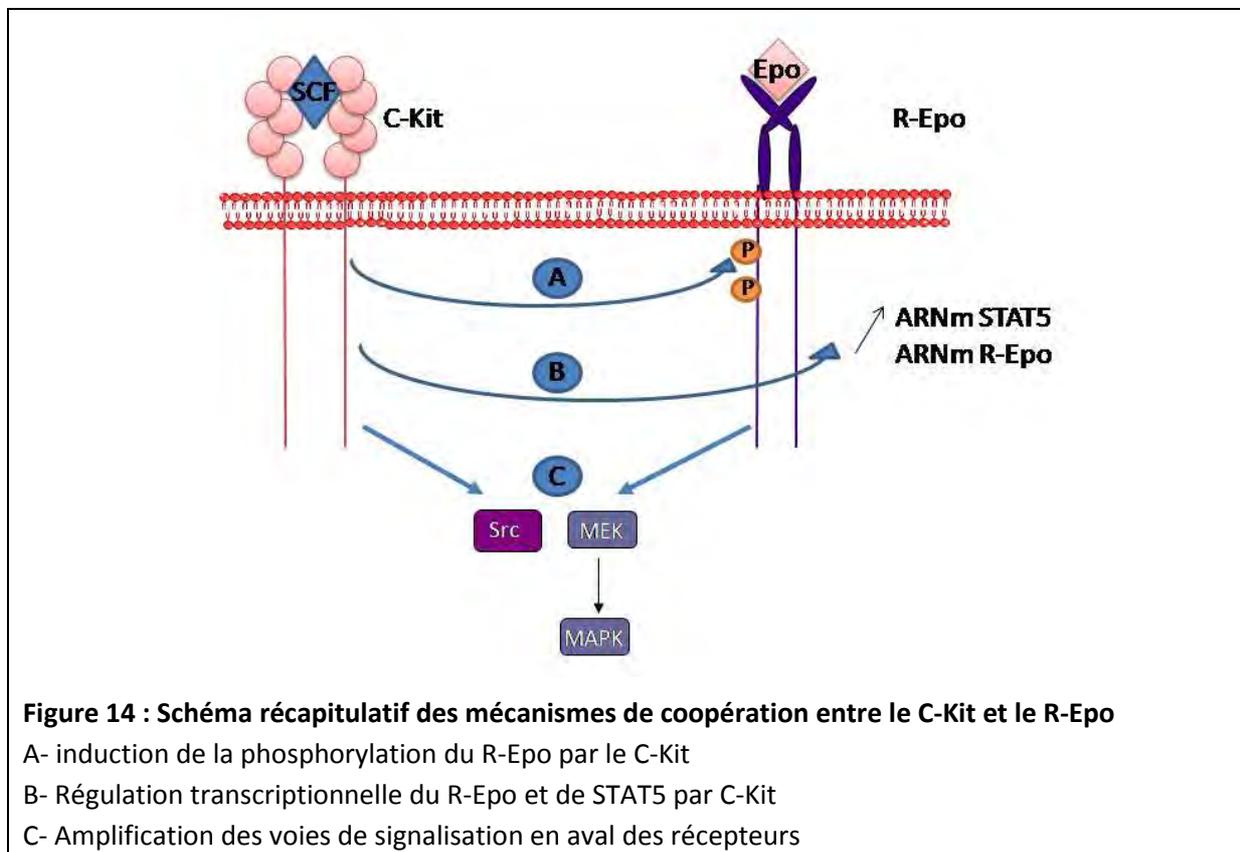
Comme nous l'avons vu précédemment, le SCF et l'Epo sont les deux facteurs de croissance essentiels au bon déroulement de l'érythropoïèse. Ces cytokines agissent par liaison sur leur récepteur respectif le C-Kit et le R-Epo, permettant l'activation de nombreuses voies de signalisation cellulaires qui seront développées ci-dessous. D'autre part, ces deux récepteurs sont exprimés de façon différentielle au cours de l'érythropoïèse (Figure 13). C-Kit est exprimé du progéniteur

érythroïde le plus précoce jusqu'au stade érythroblaste basophile (Katayama et al., 1993; Uoshima et al., 1995). Concernant le R-Epo, il n'a toujours pas été déterminé à quel stade de différenciation précis celui-ci commence à être synthétisé. Il est communément admis que le R-Epo est exprimé au stade BFU-E avec un maximum d'expression aux stades CFU-E et proérythroblaste, puis une diminution lors de la différenciation terminale (Fraser et al., 1988; Wognum et al., 1990). D'autre part, il est probable que celui-ci soit exprimé faiblement au niveau de progéniteurs pluripotents et des BFU-E primitives, mais non sur les cellules quiescentes (Berardi et al., 1995). D'autre part, il semble exister des mécanismes croisés de régulation de l'expression des récepteurs. En effet, il a été montré récemment que la stimulation du R-Epo par l'Epo induit une diminution de l'expression du C-Kit. Ce mécanisme ferait intervenir la src kinase Lyn puisque la surexpression de celle-ci dans des cellules pré-érythroleucémiques murines diminue l'expression du C-Kit (Kosmider et al., 2009). Une autre étude a montré que GATA-1 pouvait se fixer sur un élément régulateur en amont du gène de C-Kit laissant suggérer que l'expression de GATA-1 permet la diminution du C-Kit à la surface cellulaire de façon concomitante à l'augmentation d'expression du R-Epo (Munugalavadla et al., 2005).



Pendant la période où les deux récepteurs sont co-exprimés, ceux-ci agissent en synergie pour réguler positivement l'érythropoïèse. Cet effet synergique a été décrit par de nombreuses équipes comme ayant un rôle essentiel dans la croissance et de la prolifération cellulaire des progéniteurs érythroïdes (Arcasoy and Jiang, 2005; Sui et al., 1998). Cependant, les mécanismes d'action de cette coopération restent encore discutés. Selon plusieurs auteurs, l'Epo-R serait phosphorylé directement par C-Kit lorsque celui-ci est activé par le SCF, mais cette phosphorylation ne permettrait qu'une activation partielle du récepteur, puisque STAT5a n'est pas activé (Jacobs-Helber et al., 1997; Wu et al., 1995a). D'autre part, il a été montré une association entre les deux récepteurs au niveau intracytoplasmique permettant la phosphorylation du R-Epo mais non sa dimérisation (Wu et al., 1995a).

En opposition avec les études citées ci-dessus, d'autres expériences utilisant un R-Epo tronqué au niveau des résidus tyrosines suggèrent que la phosphorylation de celui-ci n'est pas nécessaire pour l'effet synergique entre le C-Kit et le R-Epo ((Miller et al., 2002; Li et al., 2003b). La coopération entre les deux récepteurs ferait appel à des mécanismes transcriptionnels. En effet, le SCF augmente la transcription de STAT5a permettant une activation plus importante de celui-ci par le R-Epo (Kapur and Zhang, 2001). D'autre part, la transcription du R-Epo a aussi été trouvée augmentée après activation du C-Kit dans des cellules leucémiques HLM/SE (Sato et al., 1998). La synergie semble enfin s'effectuer au niveau des voies de signalisation en aval des récepteurs. Par exemple, il a été montré les protéines ERK1/2, impliquées dans la prolifération et la survie des érythroblastes, étaient phosphorylées plus intensément et plus longtemps lors d'une co-activation SCF/Epo comparé aux cytokines seules (Sui et al., 1998). Enfin, les Src kinases pourraient avoir un rôle dans cette synergie puisque des mutations du récepteur C-Kit pour des tyrosines essentielles dans l'activation des Src abolissent la coopération de celui-ci avec le R-Epo sur la survie et la prolifération des progéniteurs et précurseurs érythroïdes (Hong et al., 2008; Tan et al., 2003). D'autre part, les auteurs de ce papier ont retrouvé un effet moindre avec des C-Kit mutés au niveau de la fixation de la PI3K (Y719F), PLC- $\gamma$  (Y728F), Grb2 (Y702F) ou Grb7 (Y934F) (Tan et al., 2003). En résumé, s'il est formellement démontré que le SCF et L'Epo ont un effet synergique sur la prolifération des érythroblastes, le mécanisme d'action de cette synergie est complexe et partiellement élucidé (Figure 14).



### 3 Principales voies de signalisations activées lors de l'érythropoïèse

Les voies de signalisations impliquées dans l'érythropoïèse sont nombreuses et peuvent être activées par plusieurs facteurs de croissance, à l'exception de la voie STAT5 spécifique de l'activation du R-Epo. Les principales voies détaillées ci-dessous sont les voies des MAPkinase, PI3-kinase/Akt et le facteur de transcription STAT5. Il est à noter que l'activation des récepteurs à facteur de croissance et plus particulièrement du R-Epo est transitoire et qu'il existe des mécanismes de rétrocontrôle négatifs mis en œuvre afin de réguler l'intensité de la signalisation. Ces systèmes de régulation négative ne seront pas détaillés dans cette thèse.

#### 3.1 STAT5a-b

STAT5 fait partie des facteurs de transcription de la famille STAT. Il possède un domaine de fixation à l'ADN, un domaine transactivateur, ainsi qu'un domaine SH2 et une tyrosine phosphorylable par JAK2. Il est à noter que STAT1 et STAT3 peuvent être phosphorylés par JAK2 mais semblent jouer un rôle dans l'érythropoïèse (Halupa et al., 2005; Kirito et al., 2002; Kirito et al., 1997). STAT5 existe sous deux isoformes STAT5a et b qui présentent plus de 96 % d'homologie au niveau protéique. Les deux protéines peuvent s'activer soit par fixation de leur domaine SH2 aux résidus 344 et 402 du R-Epo, soit par liaison directe avec JAK2 (Damen et al., 1995). La phosphorylation des deux isoformes induit la formation d'homo ou d'hétérodimères STAT5a/b, puis leur translocation nucléaire. Le rôle de STAT5 dans l'érythropoïèse n'est pas encore clairement élucidé. Les souris initialement décrites comme invalidées pour les gènes STAT5a et STAT5b ont présenté de façon surprenante une érythropoïèse adulte normale (Teglund et al., 1998). Cependant, il a été montré par la suite que ces souris (maintenant référencées STAT5a/b<sup>ΔN/ΔN</sup>) produisaient une forme tronquée N-terminale de STAT5a-b pouvant activer une partie des gènes cibles de STAT5 (Moriggl et al., 2005). Le vrai modèle KO est maintenant caractérisé et présente un phénotype hématopoïétique plus sévère avec une profonde anémie microcytaire ayant pour conséquence une mortalité périnatale presque complète (Kerenyi et al., 2008).

STAT5 a un rôle important dans l'érythropoïèse terminale. En effet, la forme constitutivement active de STAT5 permet une érythropoïèse normale en l'absence du R-Epo et de JAK2 (Grebien et al., 2008). Les cibles transcriptionnelles directes de STAT5 sont Bcl-XL, pim-1, c-myc, les cyclines-D, l'oncostatine

M et la famille des SOCS qui jouent un rôle dans la prolifération, l'apoptose et la différenciation. Parmi toutes ces cibles, la protéine anti-apoptotique Bcl-XL joue un rôle primordial dans la survie des précurseurs érythroïdes. En effet, au cours de la différenciation érythroïde, une augmentation importante de l'expression de Bcl-XL est observée à partir du stade BFU-E avec un pic au stade polychromatophile ((Dolznic et al., 2001) et pour revue voir (Testa, 2004)). Les souris KO pour Bcl-XL meurent à 13 jours de vie embryonnaire avec une apoptose massive des cellules du système nerveux central et des précurseurs érythroïdes du foie fœtal (Motoyama et al., 1995). Les cellules ES Bcl-XL<sup>-/-</sup> cultivées *in vitro* génèrent des colonies érythroïdes qui rentrent de façon massive en apoptose en fin de différenciation (Motoyama et al., 1999). D'autre part, Bcl-XL est aussi impliqué dans la synthèse de l'hème, composant essentiel de l'hémoglobine (Hafid-Medheb et al., 2003). Il est à noter que la régulation de Bcl-XL dans l'érythropoïèse n'est pas sous la seule dépendance de Stat5a et que le promoteur du gène *Bcl-XL* contient des régions régulatrices où peuvent se lier plusieurs facteurs de transcription dont GATA-1 (Grillot et al., 1997). Néanmoins, l'axe STAT5/ Bcl-XL semble primordial au bon déroulement de l'érythropoïèse, car l'anémie microcytaire observée chez les embryons STAT5<sup>-/-</sup> est due à une apoptose massive des précurseurs érythroïdes à partir du stade CFU-E du fait d'une diminution des protéines anti-apoptotiques Bcl-XL et Mcl-1 (Kerenyi et al., 2008). Enfin, l'expression constitutive de STAT5 et de Bcl-XL permet la formation et la différenciation de progéniteurs érythroïdes en l'absence d'Epo (Garcon et al., 2006).

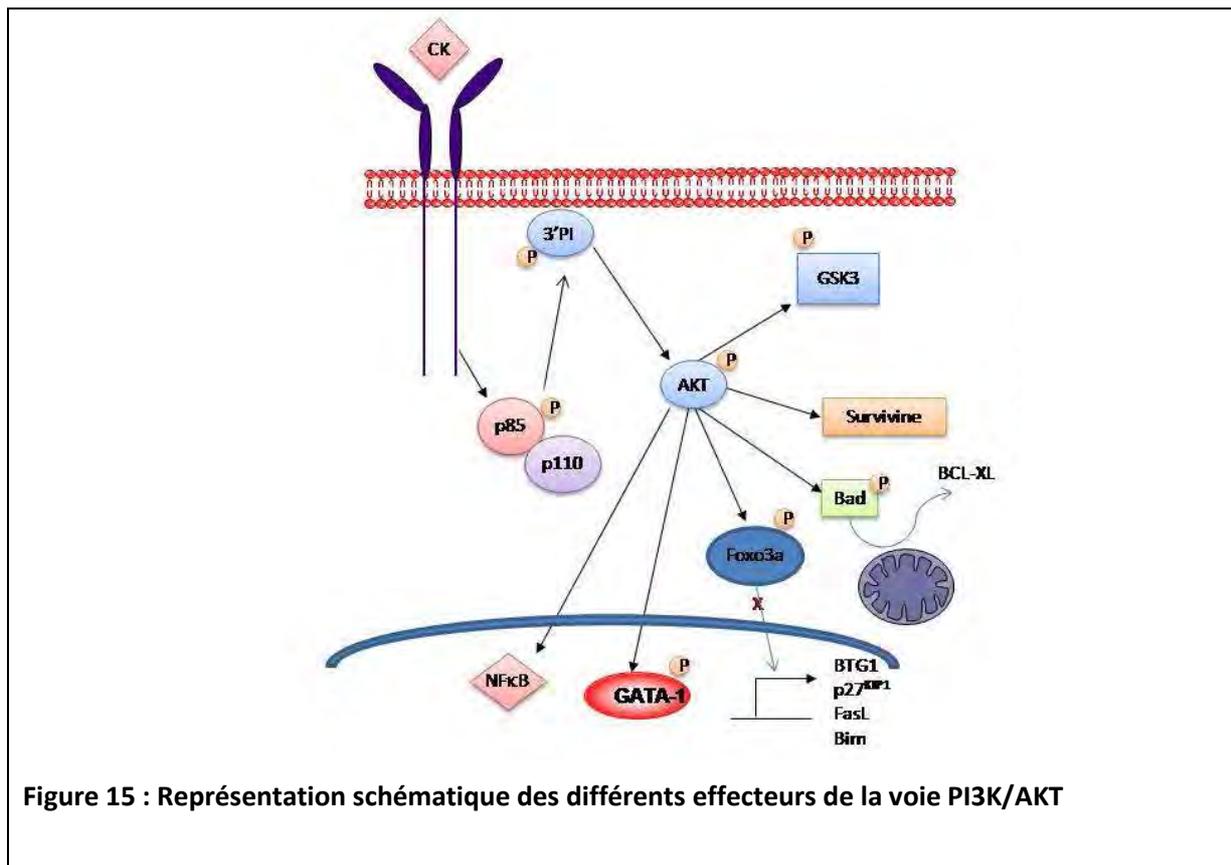
### 3.2 Voie PI3K/AKT

La voie de signalisation impliquant la phosphoinositol-3-kinase (PI3K) est présente dans de nombreux types cellulaires et peut être activée par la liaison d'un grand nombre de cytokines à leur récepteur respectifs. Elle est aussi souvent activée constitutivement lors de phénomènes de transformations oncogéniques (pour revue voir (Vivanco and Sawyers, 2002)). Concernant les érythroblastes, la voie PI3K est activée par l'Epo, le SCF mais aussi l'IL-3 et l'IL-6.

Au niveau du R-Epo, plusieurs mécanismes concourent à l'activation de la PI3kinase. La dernière tyrosine du récepteur (Y479) semble fixer directement cette enzyme. D'autre part, la PI3-kinase peut être recrutée par GAB1 phosphorylé. Cet adaptateur moléculaire est phosphorylé au sein d'un complexe GAB1-Grb2-Shc où le domaine SH2 de Shc interagit avec les deux premières tyrosines du R-Epo. Enfin, l'adaptateur moléculaire IRS-2 est constitutivement associé au complexe R-Epo/JAK2. Il est phosphorylé après l'activation du R-Epo et recrute la PI3kinase (pour revue (Casadevall et al., 2008)). Concernant le récepteur C-KIT, la PI3K peut être activée soit par fixation directe de résidus

phosphorylés du récepteur, soit par l'activation des Src kinases. Selon certains auteurs, il semblerait que la phosphorylation d'AKT par la PI3K soit plus intense et plus longue après une stimulation par le SCF comparé à l'Epo (von Lindern et al., 1999). La PI3K est un hétérodimère constitué d'une sous-unité régulatrice (p85) et d'une sous-unité catalytique (p110). La sous-unité p85 possède des domaines SH2 qui lui permettent de s'associer avec de nombreux résidus phosphotyrosine. L'activation de la PI3K par phosphorylation induit la génération du 3' phospho-inositol (PiP3), second messenger qui se fixe sur un domaine spécifique de la protéine kinase B (PKB ou AKT) et permet son activation. L'activation de la PI3K est nécessaire mais non suffisante à la prolifération et la survie des érythroblastes (Bao et al., 1999). En effet, les embryons de souris invalidés pour la sous-unité p85 (la mutation est létale *in utero* (Fruman et al., 2000)) présentent une diminution importante du nombre d'érythrocytes et de progéniteurs érythroïdes dans le foie fœtal (Huddleston et al., 2003). D'autre part, l'inhibition de la voie PI3K/AKT diminue la prolifération cellulaire et active l'apoptose de précurseurs érythroïdes (Haseyama et al., 1999).

Plusieurs substrats en aval d'AKT ont été identifiés et jouent un rôle important dans la survie et la prolifération cellulaire. Parmi ceux-ci, le facteur de transcription *forhead Foxo3a/FKHR-L1* (Kashii et al., 2000) est impliqué dans la régulation de gènes pro-apoptotiques ou anti-prolifératif tels que *FAS-L* ou *Bim* (Brunet et al., 1999), l'inhibiteur du cycle cellulaire  $p27^{KIP1}$  (Bouscary et al., 2003) et le *B cell translocation gene 1* (BTG1) (Bakker et al., 2004). Après phosphorylation par AKT, Foxo3a est séquestré par les protéines 14-3-3 dans le cytoplasme des précurseurs érythroïdes empêchant ainsi toute régulation de gènes cibles (Figure 15). Il est à noter que, de façon surprenante, les souris déficientes pour Foxo3a présentent une anémie modérée associée à une réticulocytose, (Castrillon et al., 2003). D'autre part, AKT phosphoryle la protéine pro-apoptotique Bad l'empêchant ainsi de retenir Bcl-XL dans le cytoplasme. Ainsi, lors de l'activation de la voie PI3K/AKT, Bcl-XL peut exercer ses fonctions anti-apoptotiques (Vivanco and Sawyers, 2002). AKT active aussi la survivine, un membre de la famille des IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) qui inhibe l'apoptose en inactivant les caspases et dont le rôle dans la maturation érythroïde terminale a été décrit récemment (Leung et al., 2007). Une autre cible de la voie PKB/AKT est la sérine/thréonine kinase glycogène synthetase kinase-3 (GSK3), impliquée dans le métabolisme du glycogène et dans la régulation de l'apoptose des progéniteurs érythroïdes humains primaires. L'activité de GSK3 est inhibée par l'Epo et le SCF ; son inhibition *in vitro* protège les progéniteurs érythroïdes de l'apoptose induite par la privation en Epo (Somerville et al., 2001). Enfin, AKT active les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et CREB permettant la régulation positive de gènes anti-apoptotiques ((Djordjevic and Driscoll, 2002; Nicholson and Anderson, 2002).



Par ailleurs, plusieurs expériences *in vitro* suggèrent que la PI3K serait impliquée dans la différenciation érythroïde. En effet, la surexpression d'AKT activé permet la différenciation érythroïde de progéniteurs de foie fœtal sauvages ou déficients pour JAK2 (Ghaffari et al., 2006). Cet effet n'est pas lié à une diminution de l'apoptose ou à une prolifération accrue. D'autre part, un inhibiteur chimique spécifique de la voie PI3K/AKT (LY294002) diminue l'apparition de cellules GPA positives dans une culture de cellules CD34<sup>+</sup> cultivées en présence d'Epo et de SCF (Myklebust et al., 2002). Le mécanisme est encore mal décrit mais il serait lié à GATA-1, puisqu'il a été montré qu'AKT activé par la PI3K pouvait phosphoryler GATA-1 augmentant ainsi son activité transcriptionnelle et la synthèse des gènes érythroïdes (Zhao et al., 2006).

### 3.3 Voie MAPK

La voie des MAP Kinases est activée au cours de l'érythropoïèse. Au niveau du R-Epo, plusieurs mécanismes semblent mener à cette activation de façon plus ou moins indépendante ; Ras pourrait être activé par le recrutement du complexe Grb2-SOS au niveau de certaines tyrosines du

récepteur (résidus 285, 461 et 465)(van Biesen et al., 1995). D'autre part, les adaptateurs GAB1 et IRS2 sont susceptibles d'activer Ras en plus de la PI3-kinase (Bard-Chapeau et al., 2005) mais ne semblent pas absolument nécessaire à cette activation (Bouscary et al., 2003). Concernant le C-Kit, Ras semble être activé par le recrutement du complexe Grb2-SOS. Ras activé permet la mise en œuvre d'une cascade de kinases qui phosphorylent et activent certains facteurs transcriptionnels permettant ainsi la régulation de gènes cibles. Ces voies de signalisations sont impliquées dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose des précurseurs érythroïdes. Parmi les différentes isoformes de Ras, seule K-Ras semble être nécessaire à l'érythropoïèse (Khalaf et al., 2005) et l'inactivation cette isoforme est létale *in utero* (Johnson et al., 1997; Koera et al., 1997). Les embryons présentent une anémie et une diminution de progéniteurs dans le foie fœtal. D'autre part, l'hyper-expression de Ras dans des érythroblastes de foie fœtal a provoqué une prolifération importante de CFU-E et un blocage de la différenciation terminale (Zhang et al., 2003b). Trois voies de signalisations principales sont activées en aval de Ras, la voie ERK, la voie JUNK et la voie p38.

La voie ERK1/2 est impliquée dans la prolifération et la survie des érythroblastes. ERK 1 et ERK 2 (aussi appelées p44 et P42 MAP kinases) sont des serine/thréonine kinases qui sont activées par une combinaison de phosphorylation de résidus tyrosine et thréonine effectuée par MEK1/2, elle-même activée par RAF-1 situé en aval de Ras (Turjanski et al., 2007). Les protéines ERK1 et ERK2 sont localisées majoritairement dans le cytoplasme des cellules quiescentes mais, après stimulation, une population importante d'entre elles s'accumule dans le noyau. Activées, elles catalysent la phosphorylation de nombreux substrats dans tous les compartiments cellulaires aux niveaux nucléaire, membranaire et du cytosquelette. RSK, MSK et MNK sont les principaux substrats de ERK1 et ERK2. Dans la lignée UT-7 stimulée par l'Epo, ERK1 et 2 sont rapidement phosphorylées via RAF-1 (Gobert et al., 1995). Il a été montré sur des érythroblastes humains, que la voie ERK1/2 est activée par le SCF et l'Epo et qu'un inhibiteur spécifique de cette voie (le PD98059) inhibe la croissance des érythroblastes. D'autre part, il existe une synergie d'activation de ERK1/2 par les deux cytokines, tant au niveau de l'intensité de phosphorylation que de la durée de l'activation (Sui et al., 1998).

La voie JUNK comprend une serine/thréonine kinase JNK (dont il existe trois isoformes) qui active par phosphorylation la protéine c-jun et lui permet d'exercer, au sein du complexe AP-1, ses propriétés d'activation transcriptionnelle. De façon surprenante et probablement selon le type cellulaire, l'activation de la voie JUNK peut avoir un rôle pro-apoptotique (Xia et al., 1995) ou anti-apoptotique et pro-prolifératif (Chen et al., 1996). Concernant l'érythropoïèse, l'effet pro-prolifératif et anti-apoptotique semble prédominer. En effet, JNK est activée par l'Epo dans les lignées dépendantes de l'Epo murines (HCD57) ou humaines (UT7-Epo, TF-1) et favorise la prolifération cellulaire (Jacobs-Helber and Sawyer, 2004). D'autre part, dans la lignée IL-3 dépendante BAF3, l'induction de c-jun

protège les cellules de l'apoptose induite par privation en cytokine (Shimizu et al., 1996). Enfin, des expériences sur des cellules érythroïdes murines montrent que l'inhibition de la voie JUNK bloque la prolifération essentiellement des progéniteurs immatures (BFU-E), mais pas celle des CFU-E ni des stades plus tardifs de l'érythropoïèse (Jacobs-Helber and Sawyer, 2004).

Enfin, la voie p38 semble impliquée dans les étapes terminales de la maturation érythroïde (Uddin et al., 2004). L'inhibition de cette voie bloque la différenciation érythroïde induite par l'Epo sur des cellules érythroleucémiques SKT6 alors que l'expression d'une forme active p38 induit la différenciation érythroïde en l'absence d'Epo (Nagata et al., 1998). P38 induit l'expression de la globine  $\gamma$  dans les cellules K562 et dans les progéniteurs érythroïdes primaires (Pace et al., 2003). Une activation excessive de p38 a été décrite dans les syndromes myelodysplasiques. L'utilisation d'inhibiteurs de cette voie permet de restaurer l'hématopoïèse *in vitro* chez ces patients (Navas et al., 2006).

### 3.4 Voie des src kinases

La famille des Src est une famille de 8 tyrosines kinases présentes dans de nombreux types cellulaires. Parmi celles-ci, la Src kinase Lyn (*Lck/Yes-related novel tyrosine kinase*) a été impliquée dans l'érythropoïèse essentiellement murine (Ingley et al., 2005; Karur et al., 2006; Tilbrook et al., 1997), mais aussi humaine dans une étude (Harashima et al., 2002). Le rôle de la kinase src est plus largement décrit dans l'érythropoïèse chez l'Homme (Kitanaka et al., 1994; Kubota et al., 2001; Okutani et al., 2001).

Les souris déficientes en Lyn expriment très faiblement les facteurs de transcription GATA-1 et EKLF et STAT5 et présentent anomalies de différenciation terminale associées à une érythrophagocytose médullaire importante (Ingley et al., 2005). D'autre part, les souris Lyn<sup>-/-</sup> jeunes ne présentent pas d'anémie, contrairement aux plus âgées du fait d'une érythropoïèse extra-médullaire importante provoquant une accumulation de progéniteurs spléniques (Ingley et al., 2005). D'autre part, l'inactivation sélective de Lyn dans des érythroblastes humains entraîne l'arrêt de maturation au stade d'érythroblaste basophile (Harashima et al., 2002). Au niveau moléculaire, Lyn s'associe directement au R-Epo et induit sa phosphorylation probablement sur les résidus tyrosine Y-464 or Y-479 (Chin et al., 1998). Des expériences *in vitro* montrent que les src kinases peuvent phosphoryler STAT5 (Chin et al., 1998; Okutani et al., 2001). D'autre part, celles-ci semblent jouer un rôle dans l'activation de la voie PI3K et de PLC $\gamma$  par l'Epo (Boudot et al., 2003; Kubota et al., 2001). Par ailleurs, les src sont aussi recrutées lors de la liaison du SCF au C-Kit au niveau des domaines SH2 de la partie intracytoplasmique du récepteur. Les conséquences de cette activation ont principalement été

étudiées dans la lignée mastocytaire avec l'activation de la voie JNK (Timokhina et al., 1998). Enfin, comme nous l'avons vu dans le chapitre « coopération C-Kit/R-Epo, la surexpression de Lyn dans des lignées érythroleucémiques murines provoque une diminution de l'expression de C-kit rendant ainsi les cellules uniquement dépendante de l'Epo (Kosmider et al., 2009). En résumé, le rôle des src kinases dans l'érythropoïèse semble essentiel mais il reste à définir le rôle précis des différents membres de cette famille aux différents stades de l'érythropoïèse et selon l'espèce.

### 3.5 Calcium

Contrairement aux récepteurs aux antigènes, la fixation des cytokines sur leurs récepteurs respectifs n'induit pas un flux rapide de  $Ca^{2+}$  par l'intermédiaire de la phospholipase  $Cy$ . Néanmoins, le Calcium semble avoir un rôle important dans l'érythropoïèse. En effet, l'influx de  $Ca^{2+}$  est nécessaire pour la différenciation de cellules murines érythroleucémiques (Gillo et al., 1993) et le taux de  $Ca^{2+}$  est augmenté dans les colonies dérivées de BFU-E (Miller et al., 1989). Au niveau du R-Epo, la tyrosine en position 460 est nécessaire et suffisante pour l'influx de calcium (Miller et al., 1999). Les canaux calciques impliqués dans cet influx semblent être de la famille des *transient receptor potential channel* (TRPC), puisque deux membres TRPC2 et TRPC6 sont fortement exprimés sur les cellules érythroïdes murines (Chu et al., 2004). La cotransfection du R-Epo et de TRPC2 dans des CHO provoque une importante augmentation du taux intracellulaire de  $Ca^{2+}$  (Chu et al., 2002). TRPC6 en revanche régule négativement cet effet (Chu et al., 2004). Cependant, il a récemment été montré que TRPC2 était un pseudogène chez l'Homme et que le récepteur impliqué était TRPC3 (Hirschler-Laszkiewicz et al., 2009) modulé de la même façon par TRPC6 (Hirschler-Laszkiewicz et al., 2009).

Bien que les mécanismes moléculaires ne soient pas encore élucidés spécifiquement dans l'érythropoïèse, le calcium régule de façon générale la prolifération cellulaire en modulant l'expression de proto-oncogène, la phosphorylation de facteurs de transcription, ou l'activation de la calcineurine.

### 3.6 Bruton tyrosine kinase

La Bruton tyrosine kinase (Btk) a récemment été décrite comme jouant un rôle dans l'érythropoïèse. Cette protéine, qui fait partie de la famille des tyrosines kinases cytoplasmiques Tec,

est classiquement étudiée dans la lignée lymphocytaire B où elle joue un rôle dans la sensibilité à l'apoptose (Khan et al., 1995). En effet, les patients ayant un déficit ou une mutation de Btk présentent une agammaglobulie liée à l'X, causée par un blocage dans le développement des cellules B (Conley et al., 2000). Btk a été classiquement décrit comme en étant en aval de la voie de la PI3 kinase. C'est pourquoi son rôle a été étudié dans l'érythropoïèse, notamment dans le cadre de la signalisation de C-Kit (van Dijk et al., 2000). Il a par la suite été montré que Btk s'associe avec le R-Epo et JAK2 et qu'elle peut être phosphorylée par JAK2 (Schmidt et al., 2004). Les patients déficitaires de Btk et les souris Btk<sup>-/-</sup> ne présentent pas de défaut d'érythropoïèse basale. Cependant, il a été montré dans ces souris KO, que les progéniteurs érythroblastiques ont une croissance limitée en conditions sous-optimales d'Epo et de SCF et présentent une diminution de phosphorylation du R-Epo et de JAK2 (Schmidt et al., 2004). L'équipe de Von Lindern propose un modèle dans lequel Btk a une action différente selon sa phosphorylation en aval du R-Epo ou du C-Kit. En effet, le SCF induirait la phosphorylation de Btk qui s'associerait avec le récepteur TRAIL, protégeant ainsi les progéniteurs érythroïdes de l'effet antiprolifératif de TRAIL. Par contre, la stimulation par l'Epo permettrait l'amplification des voies de signalisation de l'Epo dont STAT5 et PLC $\gamma$  ((Schmidt et al., 2004) et pour revue (von Lindern et al., 2004)).

## **4 Place du récepteur de la transferrine dans l'érythropoïèse**

Le récepteur de la transferrine est un acteur essentiel de l'érythropoïèse. Sa principale fonction est de permettre l'entrée du fer lié à la transferrine qui est indispensable à la synthèse de l'hémoglobine dans les érythroblastes. Cependant, depuis quelques années et dans d'autres modèles cellulaires, d'autres ligands du RTf ont été découverts ouvrant ainsi de nouvelles perspectives concernant d'autres fonctionnalités du récepteur.

### **4.1 Récepteurs de la transferrine : RTf1 et RTf2**

Classiquement, le récepteur de la transferrine fait référence au RTf1 retrouvé sur la majorité des cellules en prolifération, les lymphocytes activés et les progéniteurs/précurseurs érythroïdes. Cependant, en 1999, un deuxième gène a été cloné pour un autre récepteur nommé RTf2. Nous

détaillerons ici la structure et l'implication de ces deux récepteurs dans le métabolisme du fer de manière générale, et dans le cadre de l'érythropoïèse en particulier.

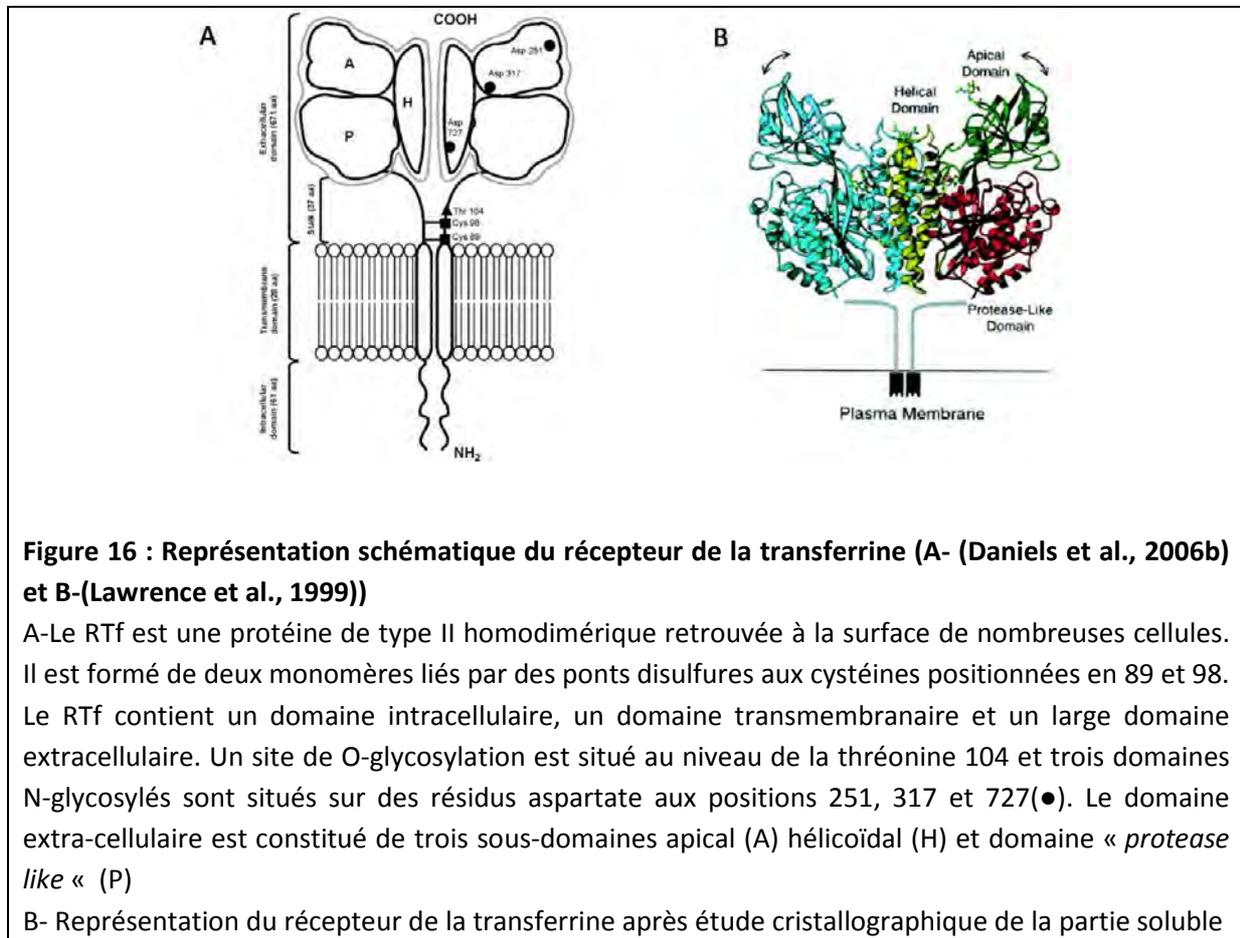
### **4.1.1 RTf1**

#### **4.1.1.1 Structure**

Le récepteur de la transferrine est une glycoprotéine homodimérique transmembranaire de 180kDa exprimée par toutes les cellules de mammifères à l'exception des érythrocytes (Trowbridge and Shackelford, 1986). Le nombre de récepteurs à la surface cellulaire est variable et corrélé à l'état de prolifération cellulaire. En effet, les cellules hautement prolifératives, comme les cellules de la crypte intestinale, les cellules B et T activées, et les précurseurs hématopoïétiques, expriment une grande quantité de RTf (Ponka and Lok, 1999). L'expression RTf1 sur les progéniteurs et les précurseurs érythroïdes sera détaillée dans le chapitre « Expression du RTf1 et du RTf2 au cours de l'érythropoïèse » ci-dessous. L'expression du RTf est également très augmentée sur des cellules tumorales comparées à leurs précurseurs non tumoraux (Faulk et al., 1980). Le RTf1 est une protéine de type 2 et ainsi, ne possède pas de peptide signal. La partie extracellulaire du récepteur est formée par 672 acides aminés (résidus 89 à 760) où sont retrouvés 3 sites potentiels de N-glycosylation, 1 site de O-glycosylation (Do et al., 1990), le domaine de liaison de la transferrine ferrique (Fe-Tf), et deux cystéines (Cys 89 et Cys98) impliquées dans la formation de ponts disulfure intermoléculaires (Figure 16A). Néanmoins, ces cystéines ne sont pas nécessaires pour la dimérisation de la molécule. La région transmembranaire du récepteur (résidus 68 à 88) est suivie d'un court domaine intracellulaire (résidus 1 à 67). Dans ce domaine intracellulaire, un motif d'internalisation (YTRF) est retrouvé (Schneider et al., 1984; Schneider and Williams, 1985).

L'ectodomaine du RTf1 peut être obtenu par protéolyse par la trypsine des cellules exprimant ce récepteur. Le clivage du site tryptique libère une forme soluble (70kDa de poids moléculaire) du récepteur constituée par les acides aminés 121 à 760. Cette forme soluble du RTf1 (sRTf1) est également retrouvée dans le sérum humain, et sa présence est inversement corrélée aux stocks corporels de Fer (Beguin, 2003; Cook et al., 1993). La cristallisation du sRTf1 montre une protéine homodimérique en « structure de papillon » composée par trois domaines principaux : un domaine « *protease-like* » composé par les résidus 122 à 188 et 384 à 606, un domaine apical composé par les acides aminés 189 à 383 et un troisième domaine hélice composé des résidus 607 à 760 (Lawrence et al., 1999) (Figure 16B). La glycosylation est très importante pour la fonctionnalité du RTf1. La mutation des sites responsables de la N-glycosylation du RTf1 cause une série d'altérations, comme

une diminution de la liaison à la transferrine, une diminution dans la formation des homodimères et de l'expression membranaire du récepteur (Williams and Enns, 1991). D'autre part, la mutation de la thréonine 104, responsable de la O-glycosylation du RTf1, rend le récepteur susceptible à son clivage et à la libération du sRTf1 (Rutledge et al., 1994).

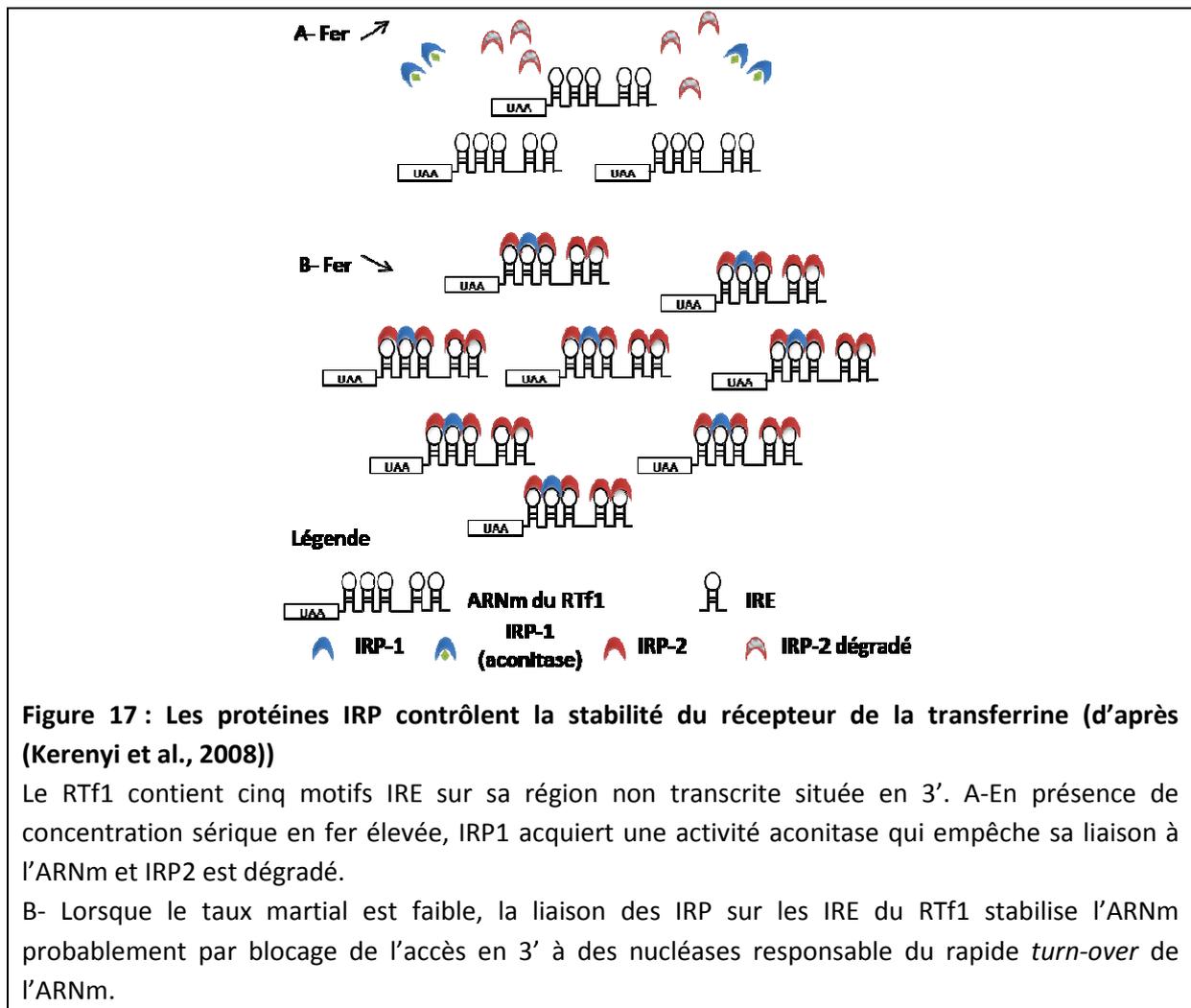


Bien que de nombreux types cellulaires expriment le RTf1 à de faibles niveaux, seulement certains d'entre eux sont strictement dépendants de celui-ci. En effet, l'inactivation du gène *RTF1* provoque une mort des souris *in utero* d'anémie sévère et d'anomalies neurologiques avant le stade (E12.5) (Levy et al., 1999). Une autre étude sur des cellules embryonnaire *RTf1*<sup>-/-</sup>, montre que ce récepteur est indispensable au développement des lignées érythroïdes et lymphoïdes, mais que les autres tissus se développent normalement en l'absence de la protéine (Ned et al., 2003). Si le rôle du RTf1 dans l'érythropoïèse semble évident du fait des besoins en fer pour la synthèse de l'hème, l'implication du RTf1 dans la lymphopoïèse et le développement neuronal est moins claire.

## 4.1.2 Régulation de l'expression du RTf1

### 4.1.2.1 Système IRP/IRE

Les IRP sont des protéines capables de se fixer sur des motifs IRE (Iron Responsive Element) situés dans des régions 5' ou 3' non traduites des ARNm codant pour des protéines de transport, de métabolisme ou de stockage du fer (pour revue voir (Eisenstein, 2000)). Entre autres, le RTf1 possède un IRE en 3'UTR. Chez les mammifères, deux protéines IRP pouvant se lier aux IRE ont été identifiées. IRP1, aussi appelée aconitase cytosolique (ACO1), possède une activité aconitase et un complexe fer-souffre (Fe-S). L'activité aconitase d'IRP1 et sa capacité à lier les IRE sont mutuellement exclusives, permettant une fine régulation de la fonction de la protéine en fonction des concentrations en fer (Haile et al., 1992). D'autre part, IRP2 est homologue à 79% à IRP1 mais ne possède pas d'activité aconitase, ni de complexe Fe-S. Ainsi, en présence de fer, le complexe Fe-S de IRP1 se forme permettant une activité aconitase de la protéine, tandis qu'IRP2 est dégradée par le protéasome. Par contre, en faible concentration ferrique, le complexe est déstabilisé et la protéine acquiert une activité de liaison au IRE. La fixation du complexe en 3'UTR du RTf permet la stabilisation de l'ARNm (Figure 17). La génération de souris invalidées pour *IRP1* et *IRP2* met en évidence le rôle primordial d'IRP2 dans la stabilisation de l'ARNm du RTf1. En effet, l'ablation du gène *IRP2* entraîne une diminution de l'expression du RTf1 menant à une anémie microcytaire, contrairement aux souris *IRP1*<sup>-/-</sup> qui n'ont pas de phénotype apparent (Galy et al., 2005) (Cooperman et al., 2005). Par ailleurs, IRP-2 semble avoir son activité modulée par d'autres facteurs que la concentration ferrique. En effet, IRP2 semble être régulé par STAT5 dans les érythroblastes, puisque les souris *STAT5*<sup>-/-</sup> ont une expression de la protéine IRP-2 diminuée ayant pour conséquence une diminution de l'expression du RTf1 à la surface des érythroblastes (Kerenyi et al., 2008). Par ailleurs, les agents donneurs de groupement NO<sup>+</sup> comme le nitroprussiate de sodium (NPS), provoquent une diminution de l'expression du RTf1 par dégradation de IRP2 (Kim and Ponka, 1999; Richardson et al., 1995). D'autre part, des expériences *in vitro* on montré que les IRP étaient sensibles à l'hypoxie (Meyron-Holtz et al., 2004; Toth et al., 1999), au stress oxydatif et à des stimuli pro-inflammatoires.

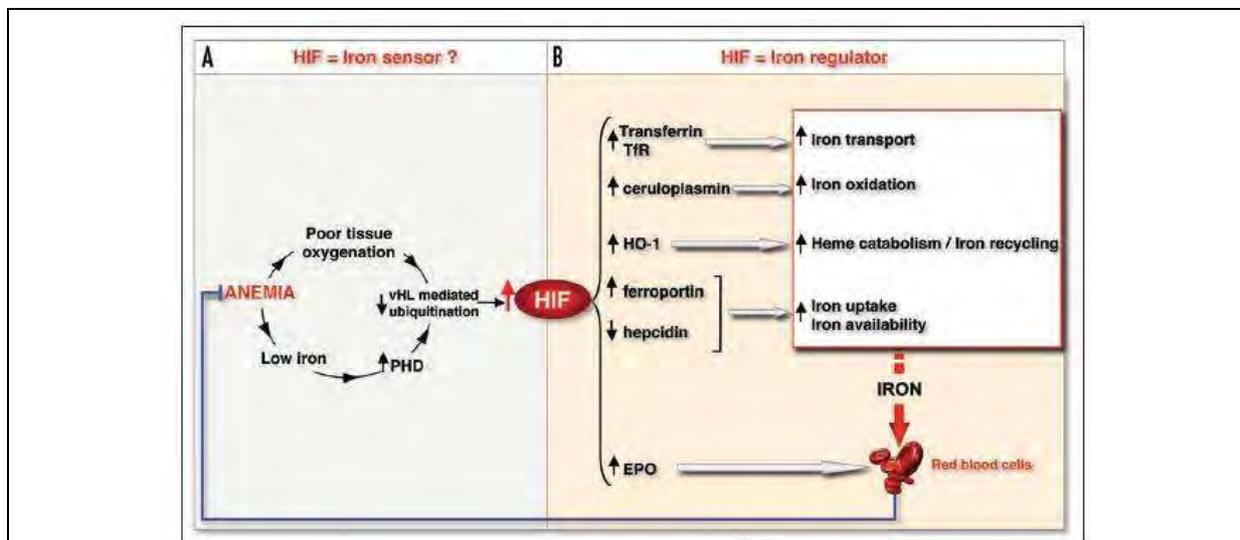


#### 4.1.2.2 Régulation par l'hypoxie

Il a été largement montré que l'expression du RTf1 est régulée positivement par l'hypoxie. Le mécanisme initialement décrit est indirect et implique l'activité IRP/IRE. En effet, une étude sur des lignées humaines d'origine hépatique HepG3B ou érythroïde K562 a montré que l'exposition des cellules à l'hypoxie provoque une augmentation importante de la liaison d'IRP1 aux IRE et diminue son activité aconitase (Toth et al., 1999). D'autre part, l'activité respective d'IRP1 et IRP2 semble dépendre de la concentration en oxygène puisqu'en faible concentration d'O<sub>2</sub> (3 à 6%) l'action d'IRP2 prédomine, contrairement à un fort pourcentage d'O<sub>2</sub> (20%) où l'activité d'IRP1 est primordiale (Meyron-Holtz et al., 2004). IRP2 ne semble pas être régulée directement par l'hypoxie mais sa dégradation via le protéasome présente des similitudes avec la dégradation d'HIF- $\alpha$ , puisqu'elle requiert une 2-oxoglutarate-oxygénase dont l'activité est dépendante du fer et de l'oxygène (Wang

et al., 2004). Néanmoins, les mécanismes moléculaires, qui sous-tendent la régulation des IRP par l'hypoxie, restent à l'heure actuelle encore incertains.

D'autre part, un mécanisme direct a été décrit simultanément par deux équipes qui ont identifié un élément de réponse à l'hypoxie (HRE) en amont du gène *RTf1* (Lok and Ponka, 1999; Tacchini et al., 1999). Ainsi, la fixation du complexe actif de HIF sur les HRE du *RTf1* permet une augmentation de l'expression du récepteur. De même, l'inactivation de la protéine pVHL entraîne une augmentation du RTf1 dépendante de HIF, ayant pour conséquences une entrée cellulaire accrue de fer lié à la transferrine (Alberghini et al., 2005). Il est à noter que l'hypoxie régule aussi l'expression d'autres gènes liés au métabolisme du fer, agissant ainsi comme un régulateur des quantités de fer disponibles pour la synthèse de l'hémoglobine (Figure 18).



**Figure 18 : Rôle de l'hypoxie dans le maintien de l'homéostasie du fer (Peyssonnaud et al., 2008)**

A- L'anémie reflétée par une déficience en fer et une diminution de l'oxygénation tissulaire, pourrait induire une diminution de l'activité prolyl-hydroxylase et une diminution de la dégradation de HIF médiée par VHL dans les hépatocytes.

B- HIF stabilisé induit une diminution de l'expression de l'hepcidine, une augmentation de la transferrine, du RTf1, de la céruloplasmine, de l'hème-oxygénase-1 (HO-1) et de la ferroportine ; conduisant ainsi respectivement à une augmentation de l'absorption intestinale du fer, de son transport, de son oxydation, de son recyclage et de son export. Une fois l'anémie supprimée, la normalisation du fer et de l'oxygénation des tissus conduit à la dégradation de HIF.

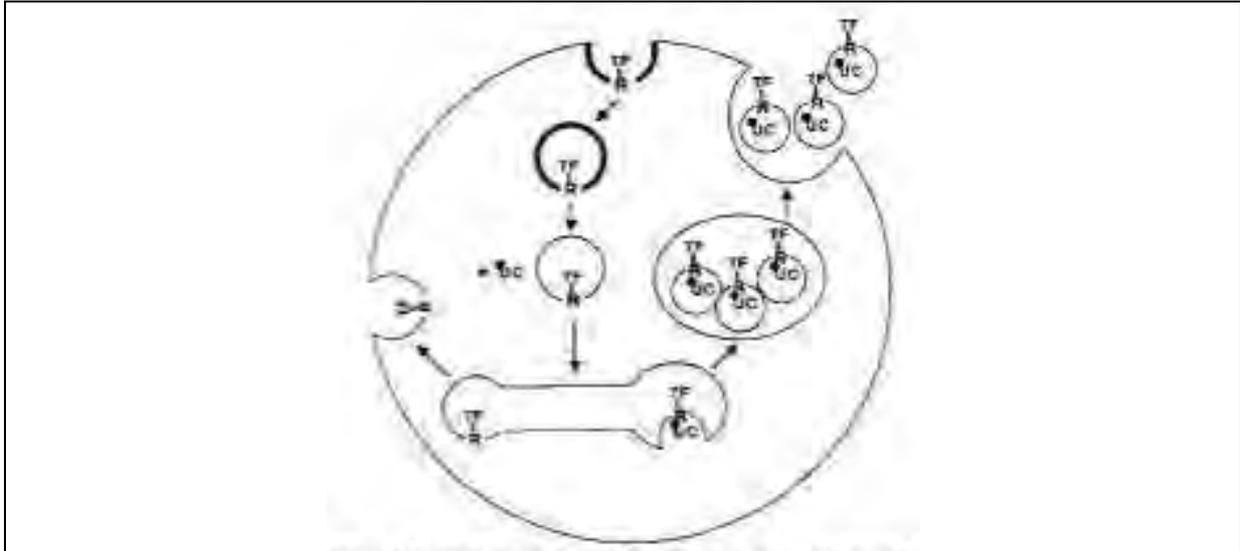
### 4.1.3 RTf2

Une deuxième isoforme du RTf, le RTf2, a été clonée en 1999 (Kawabata et al., 1999). Le gène codant pour le récepteur de la transferrine 2 possède deux transcripts nommés  $\alpha$  (2.9 kb) et  $\beta$  (2,5 kb). Il est probable que la forme  $\beta$ , qui ne possède pas les exons 1, 2 et 3, soit une protéine intracellulaire soluble exprimée de façon ubiquitaire. Néanmoins, sa fonction n'est pas encore caractérisée, et nous ne discuterons ici que du rôle de la forme  $\alpha$ . La structure primaire du RTf2- $\alpha$  est très similaire à celle du RTf1 (Kawabata et al., 1999). Ce transcrite code pour une protéine de type 2 qui présente 45% d'identité et 66% d'homologie avec la partie extracellulaire du RTf1 (Kawabata et al., 1999; West et al., 2000). Le RTf2 possède également 4 sites potentiels de N-glycosylation. L'ARN messenger du RTf2- $\alpha$  est exprimé surtout dans le foie mais aussi dans l'estomac. L'analyse de l'expression de la protéine sur des lignées cellulaires montre que le RTf2- $\alpha$  est exprimé sur un grand nombre de lignées cellulaires, dérivées de tumeurs solides et d'hémopathies malignes (Calzolari et al., 2007) et que, dans ces lignées, la proportion de RTf2 est inversement proportionnelle à celle du RTf1. La régulation du RTf2 diffère de celle du RTf1. Contrairement à l'ARNm du RTf1, les transcripts du RTf2 ne possèdent pas de séquence IRE et donc ne sont pas induits par la privation des cellules en fer. L'ARNm du RTf2 semble varier selon le cycle cellulaire avec une forte expression en phase G1 tardive et faible en phase G0/G1 (Fleming et al., 2000; Kawabata et al., 2000). D'autre part, la surcharge en fer semble stabiliser la demi-vie du RTf2. En effet, plusieurs équipes ont montré que la quantité de protéine RTf2 était augmentée *in vitro* par le traitement cellulaire à la Fe-Tf (Deaglio et al., 2002; Johnson and Enns, 2004; Robb and Wessling-Resnick, 2004). De plus, *in vivo*, les taux de RTf2 ont été retrouvés augmentés chez la souris lors d'une surcharge martiale alimentaire ou pathologique (souris HFE<sup>-/-</sup> ou thalassémiques)(Robb and Wessling-Resnick, 2004). Le RTf2 est, tout comme le RTf1, capable de se lier à la transferrine (Kawabata et al., 1999). L'affinité du RTf2 pour la Fe-Tf est cependant moins forte que celle du RTf1 puisqu'elle est de 25nM, soit environ 25 fois plus faible que celle du RTf1 (Kawabata et al., 1999; West et al., 2000). Ainsi, le RTf2 ne semble pas avoir un rôle essentiel dans l'entrée intracellulaire du fer mais plutôt jouer un rôle de « senseur » du statut en fer de l'organisme. Jusqu'à récemment, le RTf2 humain a été décrit comme n'étant pas capable de s'associer à la protéine HFE (West et al., 2000) (voir chapitre HFE). Cependant, en 2006, l'équipe de NC. Andrews a montré que HFE pouvait interagir avec le RTf2 et qu'il existait une compétition entre le RTf2 et le RTf1 pour cette liaison (Goswami and Andrews, 2006). En présence d'une forte concentration de fer, la protéine HFE se lierait préférentiellement au RTf2 et le complexe ainsi formé permettrait de réguler positivement l'expression de l'hormone hépatique hepcidine (Goswami and Andrews, 2006; Schmidt et al., 2008). D'autre part, le RTf2 est retrouvé dans les radeaux lipidiques

qui sont des domaines de la membrane plasmique impliqués dans la transduction de signal (Calzolari et al., 2006). Enfin, il a été retrouvé des mutations du RTf2 chez des patients atteints d'hémochromatose héréditaire de type III. L'hémochromatose est une maladie de surcharge martiale multiviscérale causée dans plus de 80 % par des mutations dans le gène codant pour la protéine HFE (Camaschella et al., 2000). D'autre part, il existe un modèle murin avec mutation non-sens du gène codant pour le RTf2 (Fleming et al., 2002) ainsi qu'un modèle knock-out (Wallace et al., 2005) présentant tous les deux un phénotype de surcharge ferrique parenchymateuse retrouvé dans l'hémochromatose chez l'homme.

#### **4.1.4 Expression du RTf1 et du RTf2 au cours de l'érythropoïèse**

Les érythroblastes font partie des cellules physiologiques qui expriment très fortement le RTf1. C'est un récepteur indispensable à leur survie et les souris RTf1<sup>-/-</sup> meurent *in utero* d'anémie sévère (Levy et al., 1999). Le nombre de RTf1 exprimés sur les précurseurs érythroïdes peut varier entre 100 000 et 800 000 molécules/cellules selon le stade de différenciation cellulaire. En effet, l'expression du RTf1 augmente entre le stade BFU-E et CFU-E pour atteindre une expression très élevée sur les précurseurs érythroblastiques, avant de chuter au stade réticulocyte (Lesley et al., 1984). Les mécanismes de perte du RTf1 ont été étudiés sur des réticulocytes de chèvre. Selon les auteurs de ces études, le RTf1 serait expulsé des cellules par relargage d'exosomes contenant le récepteur intact, orienté de façon externe sur les vésicules ((Pan and Johnstone, 1983; Pan et al., 1985) et pour revue (Johnstone, 2006)). L'orientation du RTf1 vers ces exosomes mettrait en jeu une protéine chaperonne de 71-72 KDa (Davis et al., 1986a) probablement Hsc70 qui a été décrite par la suite comme jouant un rôle important dans la formation des exosomes des réticulocytes (Blanc et al., 2005) (Figure 19). Les RTf1 contenus sur les exosomes sont capables de lier la transferrine avec la même avidité que ceux situés à la surface cellulaire (Johnstone, 2006). Néanmoins, leur rôle physiologique reste inconnu. La perte du RTf1 semble éviter une accumulation de fer trop importante au niveau des érythrocytes, source de toxicité cellulaire. Une étude sur des souris invalidées pour le gène suppresseur de tumeur *pRb*, montre une altération de l'érythropoïèse de stress avec un défaut d'énucléation des érythroblastes matures et une persistance du RTf au niveau cellulaire (Spike et al., 2004). Les auteurs suggèrent que l'expression augmentée du RTf1 contribue à un stress oxydatif accru dans ces cellules.



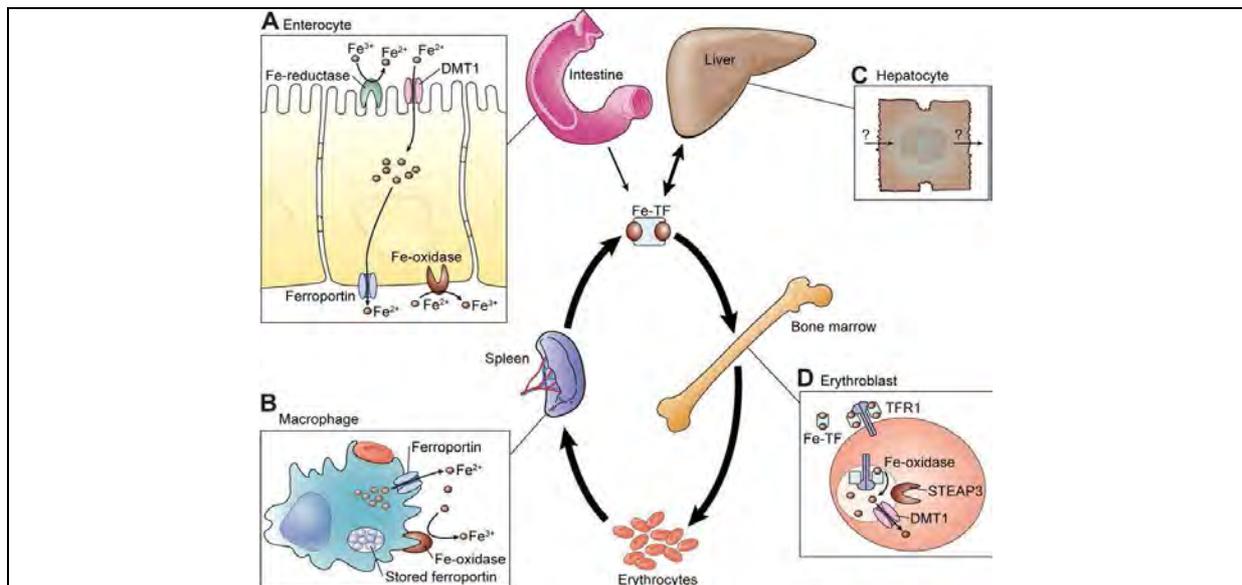
**Figure 19 : Schéma hypothétique de l'expulsion du RTf1 dans les exosomes au stade réticulocyte (Pan and Johnstone, 1983)**

Au stade réticulocyte, le RTf1 est expulsé à la surface d'exosomes

Si l'expression du RTf1 sur les précurseurs érythroblastiques est largement décrite et que son rôle dans l'érythropoïèse est indiscutable, l'expression du RTf2 est plus discutée. En effet, l'équipe de HP Koeffler a montré que le transcript du RTf2 est retrouvé en grande quantité sur les progéniteurs CD34<sup>+</sup> puis, de façon décroissante au cours de la différenciation érythroblastique (Kawabata et al., 2001b), contrairement à l'équipe d'Ugo Testa qui montre des quantités croissantes de transcript au cours de la différenciation (Sposi et al., 2000). D'autre part, des taux décroissant d'ARNm de RTf2 ont été détectés sur des cellules d'érythroleucémie murine (MEL) en cours de différenciation par l'hémine (Kawabata et al., 2001a). De façon surprenante, les auteurs ont montré que les facteurs de transcription GATA-1 et C/EBP- $\alpha$  pouvaient se fixer sur le promoteur du RTf2 augmentant ainsi son activité (Kawabata et al., 2001a). Par contre, la protéine n'a pas été retrouvée exprimée, quel que soit le stade de la différenciation (Calzolari et al., 2004). L'érythropoïèse de la souris RTf2<sup>-/-</sup> n'a pas été étudiée en détail (Wallace et al., 2005), mais le modèle de souris avec une mutation non sens pour le gène du RTf2 ne présente aucune anomalie au niveau de la numération et du taux de réticulocytes (Fleming et al., 2002).

## 4.2 Rôle du RTf dans la captation du fer par les érythroblastes

Le RTf est un acteur primordial dans l'entrée cellulaire du fer. Le fer est un nutriment fourni exclusivement par l'alimentation et absorbé au niveau du duodénum (pour revue voir (Andrews, 2008) et Figure 20). C'est un micro-élément essentiel pour les cellules, car il est impliqué dans le transport de l'oxygène (par l'hémoglobine et la myoglobine) dans la chaîne respiratoire en tant que co-facteur enzymatique des cytochromes, mais aussi dans la voie de synthèse de l'ADN et au cycle de l'acide citrique. Le fer est présent sous deux formes, le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) qui génère de l'hydroxyde de fer hautement insoluble et le fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) soluble qui peut entraîner la formation de radicaux libres. C'est pourquoi, dans des conditions physiologiques, le fer libre  $\text{Fe}^{2+}$  est rare ; le fer est plutôt retrouvé sous forme oxydée, ou associé à des protéines comme la transferrine dans la circulation ou la ferritine au niveau cellulaire. La quantité totale de fer présente dans l'organisme est de l'ordre de 4 g et on considère que celui-ci est principalement consommé par la moelle osseuse, ce qui représente 20 mg/jour, soit 80% du fer transporté par la transferrine. Le fer de la moelle osseuse sert essentiellement à la synthèse de l'hème, groupement prosthétique de l'hémoglobine responsable de la fixation de l'oxygène.



**Figure 20 : Schéma récapitulatif de l'homéostasie du fer (Andrews, 2008).**

Le cycle central décrit le trajet du fer dans le corps, de l'intestin à la moelle osseuse qui est son principal lieu d'utilisation.

A- Le fer sous forme non hémique est transporté de la membrane apicale à la membrane basale des entérocytes.

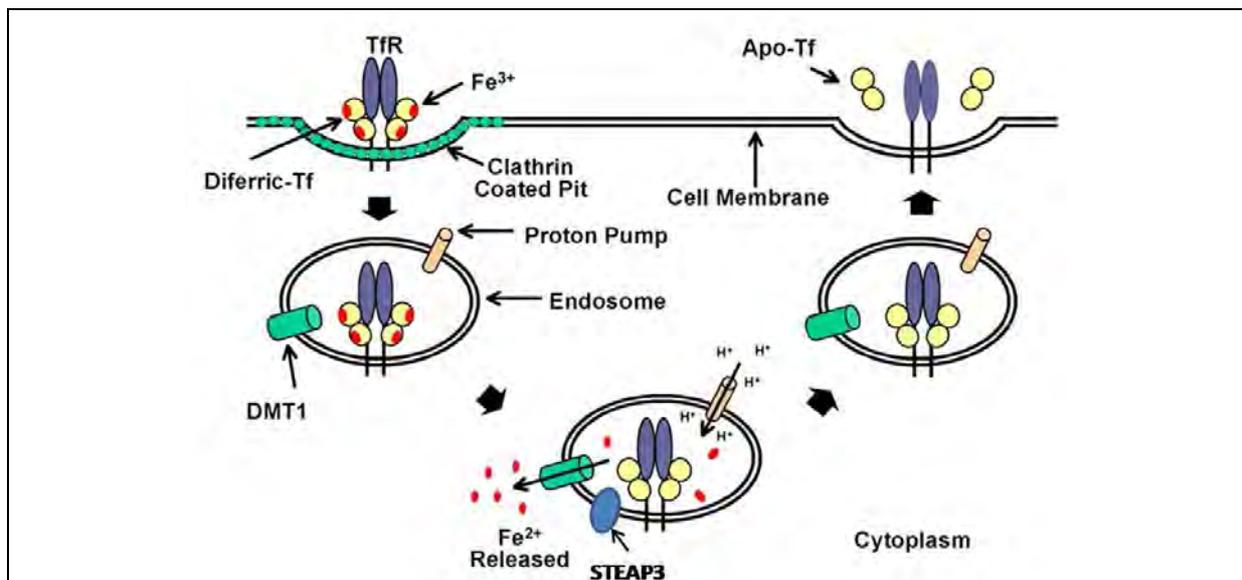
B- Erythrophagocytose et recyclage du fer par les macrophages

C- Transport du fer au niveau des hépatocytes. Les points d'interrogation indiquent que ni l'import ni l'export n'est bien élucidé

D- Entrée cellulaire du fer dans les érythroblastes via le RTf1

#### 4.2.1 Cycle d'entrée cellulaire du fer

Le RTf1 participe à la captation de la Fe-Tf dans toutes les cellules animales (Schneider et al., 1982). L'efficacité du transport est due à la capacité du récepteur à être constamment recyclé à la surface cellulaire. Le RTf1 participe aux cycles d'endocytose/exocytose au travers de structures membranaires recouvertes de clathrine. La captation de la Fe-Tf par le RTf1 est un phénomène bien établi. Le RTf1 membranaire se lie à la Fe-Tf et le complexe est endocyté par les cellules. Pendant l'acidification du pH des vésicules de recyclage (pH 6,4), le complexe Fe-Tf est dissocié puis transféré de l'endosome vers le cytosol probablement grâce au récepteur DMT1 (Fleming et al., 1998). Récemment, une ferriréductase endosomale nommée STEAP3 (*Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate*) a été identifiée dans les cellules érythroïdes par l'étude de souris anémiques nm1504 (Ohgami et al., 2005). Le Fe libéré est alors capté par des protéines de stockage cellulaire (telles que la ferritine). En pH acide la transferrine libre du Fe (apo-Tf) reste associée au RTf1 et le complexe RTf1/apo-Tf est recyclé à la surface cellulaire. En pH physiologique (pH 7,4) l'apo-Tf se dissocie du RTf1 (Klausner et al., 1983)(Figure 21).

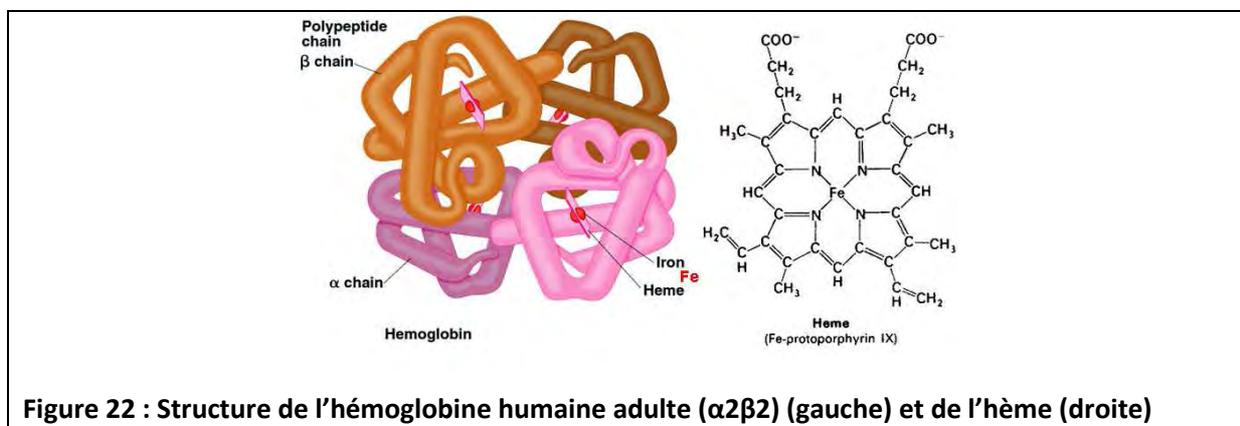


**Figure 21 : Capture cellulaire du Fer lié à la Tf par le RTf (Daniels et al., 2006a).**

L'holotransferrine ( $Fe_2$ -Tf) est reconnue par le récepteur de la transferrine (RTf) à la surface de la cellule. Le complexe RTf- $Fe_2$ -Tf pénètre dans la cellule par endocytose dans une vésicule recouverte de clathrine. Dans l'endosome le pH s'acidifie du fait de l'entrée de protons par des pompes protoniques permettant ainsi la dissociation du fer de la transferrine. Le fer serait réduit ensuite par une ferriréductase, probablement STEAP3 dans les précurseurs érythroïdes, puis transporté vers le cytoplasme par DMT1. Le RTf et l'apo-transferrine (Apo-Tf) sont finalement recyclés par fusion de la vésicule à la membrane plasmique de la surface cellulaire.

## 4.2.2 Le fer : composant essentiel de l'hémoglobine

Comme nous l'avons vu précédemment, le RTf1 est très fortement exprimé sur les précurseurs érythroïdes afin de permettre l'entrée d'une quantité importante de fer nécessaire à la synthèse de l'hémoglobine. En effet, l'hémoglobine représente environ 60 à 70 % du fer total présent dans l'organisme. D'autres facteurs exogènes, qui ne seront pas détaillées ici, sont nécessaires à la synthèse de l'hème comme la vitamine B12 et B9 ou la vitamine B6, cofacteur de l'ALAS2. L'hémoglobine est constituée de quatre chaînes de globines (deux chaînes  $\alpha$  et deux chaînes  $\beta$ ), portant chacune un groupement prosthétique hème qui contient un atome de fer (Figure 22).



La synthèse de l'hémoglobine nécessite la production coordonnée de l'hème et des globines qui la constituent. Les gènes codant pour les chaînes de globines sont organisés chez l'homme en deux clusters : le locus  $\alpha$  qui contient le gène embryonnaire  $\zeta$  et les deux gènes adultes  $\alpha$ , et le locus  $\beta$  qui contient les gènes  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\beta$ . L'hémoglobine change en effet de composition au cours du développement à la suite des changements d'expression (ou « switch ») des gènes codant pour les chaînes de globines pendant les trois stades de l'érythropoïèse. Un premier switch a lieu lors de la transition de l'érythropoïèse embryonnaire (sac vitellin) à l'érythropoïèse fœtale (foie). Le deuxième switch entre l'hémoglobine fœtale et l'hémoglobine adulte a lieu lors de la période péri-natale. Ces régulations d'expression de gènes sont dépendantes de la LCR (*Locus Control Region*) présente en amont du cluster  $\beta$  globine et d'HS40 (zone d'hypersensibilité à la DNase I) en amont du cluster  $\alpha$  globine. Au cours du développement et de la différenciation érythroïde, les gènes sont exprimés séquentiellement : les gènes exprimés précocement sont situés près de la LCR et les gènes adultes se trouvent en 3' (pour revue (Stamatoyannopoulos, 2005)). La synthèse de l'hème est partagée dans deux compartiments cellulaires, le cytosol et la mitochondrie. Tout d'abord, dans la mitochondrie, de l' $\delta$ -aminolevulinate (ALA) est formée à partir de glycine et de succinylCoA par l'ALA synthase. Cette

enzyme est présente sous deux formes, l'ALAS1 dont l'expression génique est réprimée par l'hème et l'ALAS2 dont l'expression est régulée par le système IRE/IRP. Cette étape est l'étape limitante de la biosynthèse de l'hème. L'ALA est ensuite exportée de la mitochondrie vers le cytosol. L'assemblage du tétrapyrrole et la décarboxylation des chaînes auxiliaires ont lieu dans le cytosol. Les étapes finales de la synthèse de l'hème se déroulent dans la mitochondrie avec notamment, l'incorporation du fer par la ferrochélatase. En cas de déficience d'apport en fer, la synthèse de l'hémoglobine est perturbée et les hématies contiennent alors moins d'hémoglobine qui leur donne leur couleur et sont plus petites; on parle alors d'anémie hypochrome microcytaire.

### **4.2.3 Recyclage du fer**

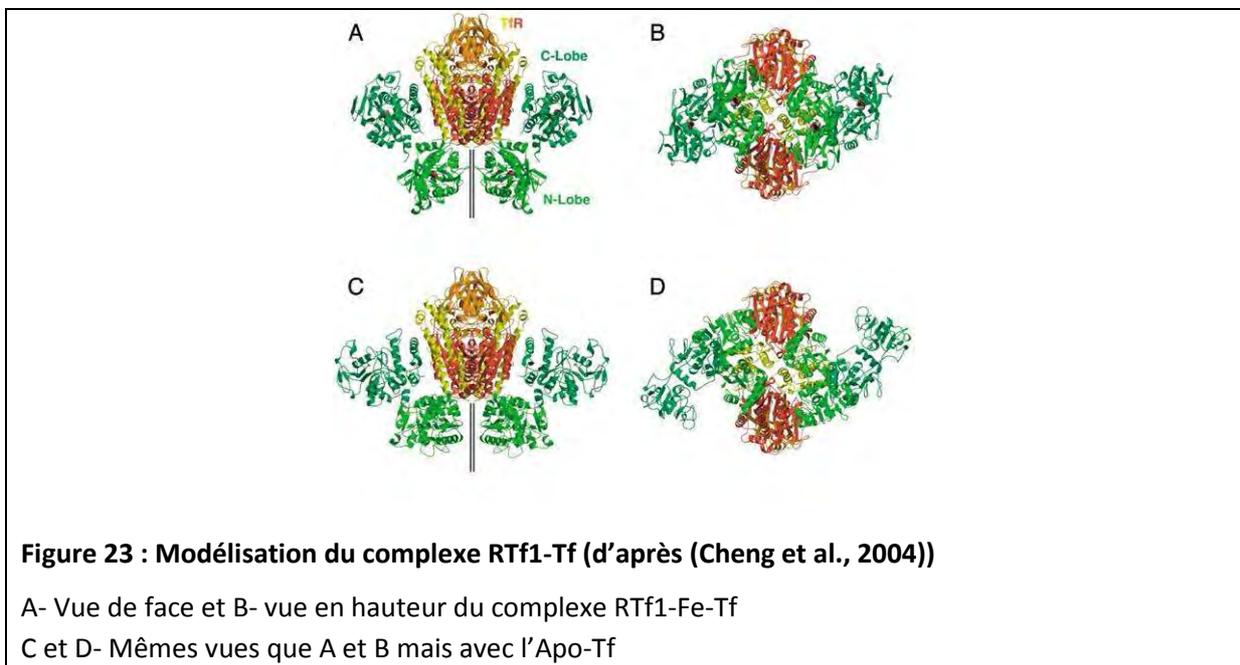
L'hémoglobine représente environ 60 à 70 % du fer total présent dans l'organisme. Lors de la sénescence des érythrocytes, ce fer est recyclé par les macrophages, selon un phénomène d'érythrophagocytose (EP). Les érythrocytes sénescents sont reconnus par les macrophages essentiellement du fait de l'externalisation de la phosphatidylsérine à leur surface. D'autres mécanismes interviennent, comme la peroxydation des lipoprotéines membranaires à leur surface, la perte de résidus sialiques ou la formation de néoantigènes de sénescence. L'érythrocyte phagocyté par le macrophage se retrouve dans un compartiment acide nommé l'érythrophagolysosome et l'hème est dégradé sous l'action de l'hème oxygénase 1 (HO-1). Le fer est ensuite exporté dans la circulation, où il peut être stocké lié à la ferritine ou réutilisé lié à la transferrine. L'érythrophagocytose a lieu essentiellement dans la pulpe rouge de rate, mais aussi probablement dans la moelle osseuse et dans le foie, par les cellules de Kupffer (Knutson and Wessling-Resnick, 2003).

Par ailleurs, il était admis jusqu'à présent, que le fer non incorporé dans l'hème par les précurseurs érythroïdes restait stocké dans les érythrocytes jusqu'à leur sénescence. Depuis 2004, l'équipe de Quigley a décrit une protéine de l'export de l'hème nommé FLVCR qui semble nécessaire à l'érythropoïèse terminale (Quigley et al., 2004). Les souris invalidées pour le gène *FLVCR* ne sont pas viables et les embryons présentent un défaut d'érythropoïèse terminale, ainsi que des déformations cranio-faciales retrouvées dans l'anémie de Blackfan-Diamond (Keel et al., 2008). Lorsque le gène est inactivé après la naissance des souris, celles-ci développent une importante anémie macrocytaire. L'hypothèse de cette équipe est que, l'accumulation d'hème non nécessaire à la synthèse de l'hémoglobine est toxique pour les érythroblastes et qu'il existe un système de valve permettant de faire sortir l'hème non consommé et potentiellement toxique.

## 4.3 Ligands du RTf1

### 4.3.1 Transferrine

La transferrine (Tf), découverte en 1946, est le principal transporteur sérique du fer (Ponka and Lok, 1999; Schade and Caroline, 1946) ; c'est une protéine de 679 acides aminés, de structure bilobée et dont les deux lobes (N-terminaux et C-terminaux), peuvent chacun lier un ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ). La conformation de la protéine est variable selon sa liaison au fer et selon le pH. Dans sa conformation ouverte non liée au fer (Apo-transferrine ou Apo-Tf), les deux domaines sont bien séparés afin de faciliter la liaison aux ions  $\text{Fe}^{3+}$ . La liaison du fer à la transferrine se fait via un anion, classiquement un carbonate (deux tyrosines, une histidine, et une asparagine). La transferrine est alors appelée ferrotransferrine (Fe-Tf). Une étude sur la structure du complexe RTf1-Tf montre que la conformation de la transferrine change lors de sa liaison au RTf1. Le lobe N-terminal est situé entre la membrane et l'ectodomaine du RTf1 et le lobe C-terminal se fixe au niveau du domaine hélical (Cheng et al., 2004). D'autre part, à pH acide, le site de la liaison du fer s'ouvre, facilitant la libération de celui-ci (Figure 23).



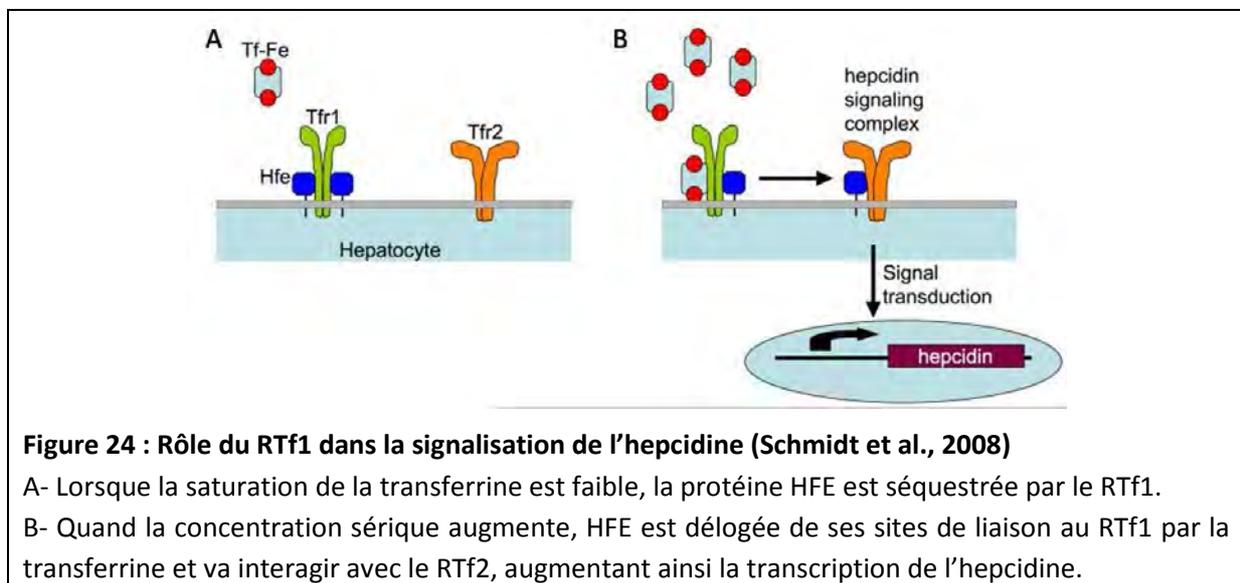
Le gène de la transferrine présente de nombreux polymorphismes dont les 3 principaux sont nommés B, C et D (Welch and Langmead, 1990). La transferrine est produite principalement par le foie et en moindre mesure par les testicules et le cerveau (Idzerda et al., 1986). Son expression est modulée par de nombreux facteurs comme l'apport en fer, l'inflammation et l'hypoxie (Rolfs et al.,

1997). Cette expression est tissu-spécifique du fait de la présence d'un *enhancer* à 3.6 kB du gène uniquement dans les cellules hépatiques (Sawaya et al., 1996). Il a été montré chez le rat, qu'un régime pauvre en fer augmente la transcription hépatique de la transferrine (Idzerda et al., 1986). Une prise de glucocorticoïde ou d'œstrogène augmente la synthèse de la transferrine, tandis que la libération de cytokines pro-inflammatoires la diminue. Outre sa fonction dans le transport du fer, la transferrine a été décrite comme ayant d'autres rôles, notamment antimicrobiens, pro-prolifératifs et différenciants. En effet, l'apo-Tf permet d'une part, de réduire les concentrations de fer libre favorisant les infections microbiennes (von Bonsdorff et al., 2003) et d'autre part, de réduire l'adhésion des bactéries (Ardehali et al., 2003). La transferrine a aussi montré un rôle pro-prolifératif et différenciant, notamment sur les cellules oligodendrogiales (Garcia et al., 2003). L'Apo-Tf été utilisée en thérapeutique dans l'atransferrinémie, une maladie très rare caractérisée par une anémie microcytaire, associée à une surcharge en fer tissulaire (Hayashi et al., 1993). Son utilisation en tant qu'agent anti-oxydatif, dans l'ischémie rénale et les complications liées au diabète, a été suggérée bien que peu évaluée (pour revue voir (Gomme et al., 2005)). Enfin, des préparations de Fe-Tf et d'Apo-Tf ont été brevetées en tant qu'agent stimulant de l'érythropoïèse, en association ou non avec de l'érythropoïétine (patent US 2003/0229012 A1), dans l'anémie consécutive aux insuffisances rénales chroniques.

#### **4.3.2 HFE**

Le RTf1 peut être associé à une protéine membranaire de la famille des CMH non-classiques, dénommée protéine de l'hémochromatose (HFE) (Feder et al., 1998; Lebron et al., 1998; Parkkila et al., 1997). Comme toutes les protéines du CMHI, la protéine HFE a besoin de se lier à la  $\beta$ 2-microglobuline pour se replier correctement et se retrouver à la surface des cellules. Cependant, au vue de sa structure tridimensionnelle, il semble qu'elle soit incapable de présenter un peptide, contrairement aux autres molécules du CMH (Lebron et al., 1998). Des études de cristallisation montrent que la stœchiométrie du complexe RTf1:HFE (2:1) est différente de celle du complexe RTf1: transferrine (2:2). Le complexe RTf1/HFE pourrait être dépendant des interactions entre des résidus histidine et des interactions dépendantes de pH (Bennett et al., 2000; Lebron et al., 1998). Le complexe HFE/RTf1 peut être internalisé, mais il se dissocie dans des vésicules d'acidification (Davies et al., 2003). L'ARNm du gène HFE est présent en grande quantité dans l'intestin grêle et dans le foie, et faiblement détecté dans les tissus lymphoïdes. L'ARNm d'HFE n'a pas été retrouvé sur la lignée érythroïde. La protéine a été retrouvée colocalisée avec le RTf1, dans les cryptes des villosités

duodénales (Waheed et al., 1999) et à la membrane apicale des syncytiotrophoblastes du placenta (Parkkila et al., 1997). D'autre part, la protéine HFE a été retrouvée dans les hépatocytes (Holmstrom et al., 2003; Zhang et al., 2004). Le rôle de la protéine HFE est complexe et semble être dépendant du type cellulaire. Dans les cellules qui n'exportent pas le fer (HeLa, HEK293), la surexpression de la protéine entraîne une diminution de l'entrée intracellulaire du fer. En effet, l'association de la HFE au RTf1 diminue l'affinité apparente du récepteur pour la transferrine (Feder et al., 1998), car le site de fixation de la HFE au RTf1 est proche de celui de la transferrine (Lebron and Bjorkman, 1999). A l'inverse, dans les cellules qui exportent naturellement le fer via l'exporteur ferroportine, comme la lignée duodénale HT29 (Davies and Enns, 2004), ou la lignée de type macrophagique THP1 (Drakesmith et al., 2002), la surexpression de HFE augmente la concentration intracellulaire de fer en inhibant l'export de celui-ci par un mécanisme probablement RTf1 indépendant. Une nouvelle théorie proposée en 2008, suggère que le RTf1 régule l'activité de la protéine HFE en la séquestrant. La liaison de la transferrine au RTf1 déplacerait la protéine HFE de celui-ci, la rendant active et permettant l'augmentation de l'expression de l'hepcidine (Schmidt et al., 2008) (Figure 24). Récemment la nécessité de l'interaction entre l'HFE et le RTf2 dans l'induction de l'hepcidine a clairement été démontrée (Gao et al., 2009) selon un mécanisme probablement dépendant de la voie de signalisation BMP-SMAD (Kautz et al., 2009).



Depuis 1996, la protéine HFE a été identifiée comme acteur principal de l'hémochromatose héréditaire. En effet, une mutation du résidu Cys-282 de la HFE en Tyr (C282Y) a été retrouvée chez 85% des patients atteints d'hémochromatose (Feder et al., 1996). Cette mutation empêche la liaison de la protéine HFE à la  $\beta 2$ -microglobuline et donc son adressage à la membrane et l'interaction avec

le RTf1 (Feder et al., 1997). Il a été retrouvé, chez d'autres patients, des mutations plus rares du gène HFE (H63D et S65C)(Pointon et al., 2000).

En résumé, la protéine HFE est une protéine clé de la régulation de l'homéostasie du fer. L'étude de sa fonctionnalité a permis de mettre en évidence un nouveau rôle du RTf1, qui est présenté pour la première fois en tant que molécule permettant la « séquestration » d'une autre.

### **4.3.3 Arenavirus**

Récemment, le RTf1 a été décrit comme étant le récepteur de virus du groupe des arénavirus du nouveau monde (Tacaribe serocomplex)(Radoshitzky et al., 2007). Les virus du genre Arénavirus font partie de la famille des Arenaviridae qui sont des virus enveloppés à ARN simple brin. Parmi ceux-ci, les arénavirus du nouveau monde Machupo, Guanarito, Junin et Sabia, font partis des cinq arénavirus qui peuvent causer des fièvres aiguës hémorragiques dont l'issue est fatale dans plus de 30% des cas. Les équipes de Farzan et Chloé ont montré que les arénavirus du nouveau monde n'utilisent pas l' $\alpha$ -dystroglycan pour infecter les cellules, contrairement aux autres arénavirus, mais le RTf1. La glycoprotéine d'entrée (GP1) du virus a été retrouvée associée au RTf1 et la surexpression RTf1 humain sur des CHO (*Chinese Ovary Hamster*) permet d'augmenter l'infection virale. Par contre, la surexpression RTf2 n'a pas provoqué une infection virale accrue. L'entrée des virus semble être bien spécifique du RTf1 puisque l'addition de RTf1 soluble ou d'un anticorps anti-RTf1 inhibe l'infection cellulaire. Il est à noter que toutes ces expériences ont été effectuées *in vitro* sur des lignées transfectées. Néanmoins, le RTf1 est classiquement retrouvé sur les macrophages et les lymphocytes T activés qui sont les cibles majeures de l'infection par arénavirus (Oldstone, 2002), ainsi que sur les cellules endothéliales qui jouent un rôle central dans la physiopathologie des fièvres hémorragiques (Peters and Zaki, 2002). D'autre part, les auteurs ont montré qu'*in vitro*, la déplétion en fer du milieu de culture par chélateur renforce l'efficacité de l'infection, alors que l'addition de fer soluble (citrate d'ammonium ferrique) la diminue (Radoshitzky et al., 2007). Les auteurs suggèrent sans le démontrer que cette interaction entre le pouvoir infectant et les concentrations en fer serait due à la différence de densité de RTf1 (élevée en présence de chélateurs, basse en présence d'ammonium ferrique) et évoquent la possibilité d'une prophylaxie antivirale à base de fer. Par la suite, la même équipe a montré que certains arénavirus non pathogènes pouvaient utiliser comme récepteur le RTf1 d'autres espèces que l'homme, ainsi que le RTf1 humain muté au niveau extracellulaire (Abraham et al., 2009). Cette étude suggère que des modifications mineures sur la glycoprotéine d'entrée (GP1) pourraient permettre à ces virus d'infecter les cellules par le RTf1,

augmentant ainsi leur pathogénicité. En résumé, la caractérisation du RTf1 en tant que récepteur viral n'en est qu'à ses balbutiements et de nombreux aspects, notamment concernant le nombre de virus concernés et l'impact *in vivo* de cette interaction, restent encore non élucidés.

#### **4.3.4 IgA**

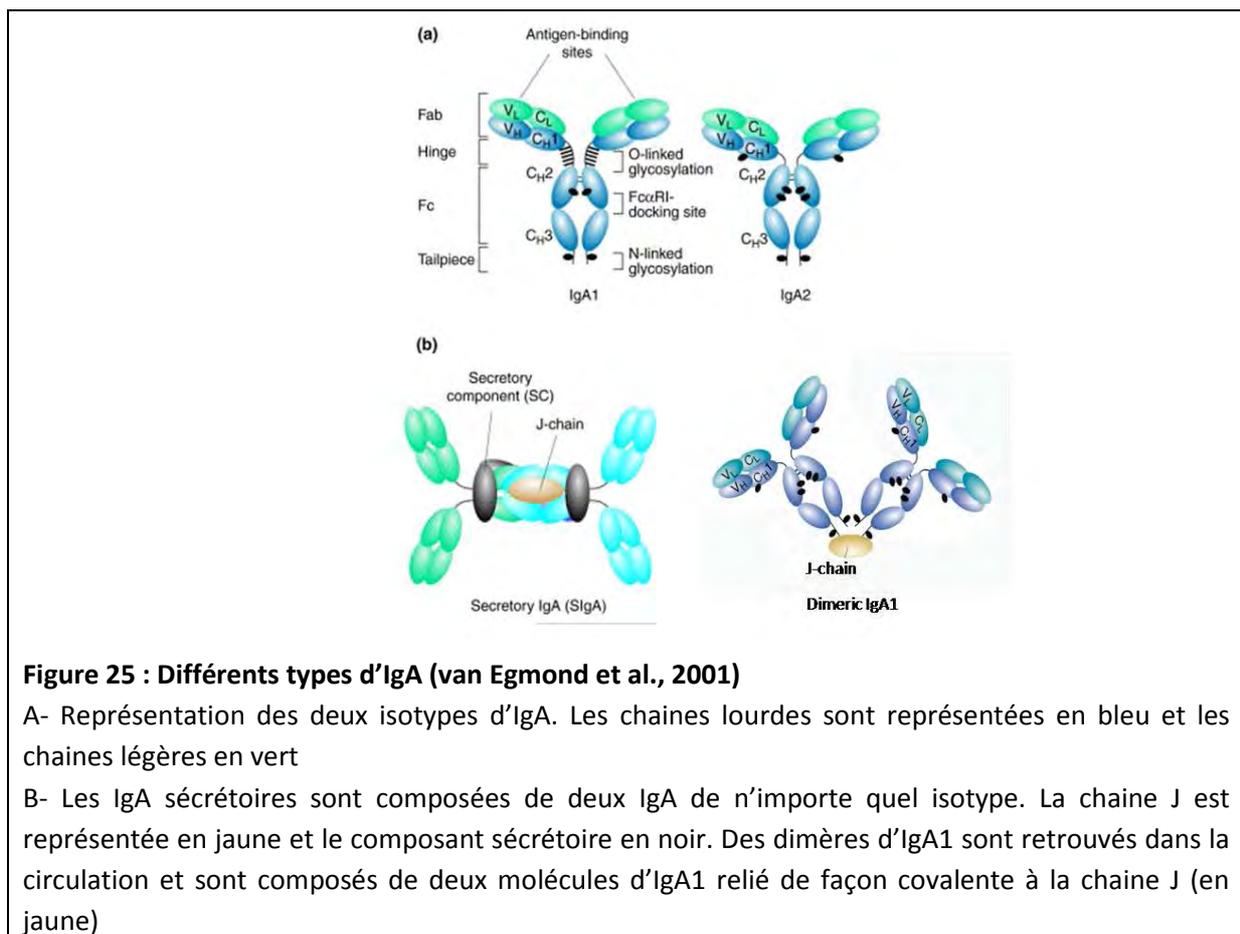
Depuis 2001, les immunoglobulines sériques A1 ont été décrites comme étant un ligand du récepteur de la transferrine (Moura et al., 2001), et l'implication de cette interaction a été étudiée dans deux pathologies, la néphropathie à IgA (N-IgA) (Moura et al., 2004a; Moura et al., 2001) et la maladie cœliaque (Matysiak-Budnik et al., 2008). Il existe deux sous-classes d'IgA, les IgA1 et les IgA2, retrouvées de façon prédominante respectivement au niveau des compartiments sérique et muqueux. Parmi ces deux sous-classes, seules les IgA1 ont été définies comme ligands du RTf1 (Moura et al., 2001) et, par conséquent, uniquement celles-ci seront décrites dans cette thèse. Après une brève description de la structure des IgA1, leur fonction sera développée, ainsi que leur implication dans les deux pathologies citées ci-dessus.

##### **4.3.4.1 Présentation des IgA**

Les immunoglobulines A humaines constituent la deuxième classe d'immunoglobulines humaines sériques après les IgG. Elles ont été initialement détectées, il y a 50 ans, dans la circulation sanguine et lymphatique, puis dans les sécrétions mucoales. L'existence de différentes formes d'IgA présentes dans deux compartiments distants, constitue la grande particularité des IgA face aux autres Immunoglobulines (Ig) (Conley et al., 1987; Monteiro and Van De Winkel, 2003). En effet, il existe deux sous-classes d'IgA chez l'homme, les IgA1 et les IgA2, mais il est à noter que le nombre de sous-classes est très variable selon les espèces. En effet, la souris et le rat n'en possèdent qu'une et le lapin en possède 13 (Kerr, 1990; Knight and Hanly, 1975; Phillips-Quagliata, 2002). La différence entre les IgA1 et les IgA2 humaines tient essentiellement à la présence sur la chaîne lourde des IgA1, de 22 acides aminés supplémentaires dont 13 sont situés dans la région charnière (Figure 25). L'absence de ces 13 acides aminés confère aux IgA2 une résistance à l'action des protéases bactériennes intestinales, comme celles sécrétées par *E. Coli*, *H.influenzae* et *N.meningitidis* (Mulks and Shoberg, 1994) et modifie leur composition glucidique.

Les IgA sériques représentent 15% à 20 % des immunoglobulines totales du sérum humain et sont composés de 90% d'IgA1. Elles sont majoritairement originaires de la moelle (Kutteh et al., 1982) et,

à moindre degré, de la rate et des ganglions (Mestecky et al., 1983). La production d'IgA est massive et bien supérieure à toutes les autres Ig (70 mg/kg/jour versus 35 mg/kg/jour pour les IgG, 8 mg/kg/jour pour les IgM et <0,5 mg/kg/jour pour les IgD et les IgE). Cependant, les taux sériques IgA sont cinq fois moins importants que ceux des IgG car les IgA ont une demi-vie courte (3 à 5 jours pour les IgA, contre 24 à 30 jours environ pour les IgG) (Conley et al., 1987). Les IgA sécrétoires (sIgA) sont synthétisées dans les muqueuses et représentent deux tiers des IgA totales (Mestecky and Russell, 1997). Les sIgA sont formées par des dimères d'IgA (comportant des IgA2 et/ou IgA1), associés à une protéine de glycosylation hétérogène (50-90kDa), dénommée composant sécrétoire (CS) et générée par clivage de la région extracellulaire du récepteur aux immunoglobulines polymériques (Rplg). Le CS confère en partie la résistance des IgA sécrétoires à l'action des protéases bactériennes. La proportion d'IgA1 et d'IgA2 présente dans les sIgA varie selon la localisation des plasmocytes producteurs. En effet, les IgA1 sont présentes à 85% dans la muqueuse respiratoire, à 80% dans la muqueuse duodénale, à environ 60% dans la muqueuse jéjuno-iléale, et à 35 % dans la muqueuse colique (Crago et al., 1984).



**Figure 25 : Différents types d'IgA (van Egmond et al., 2001)**

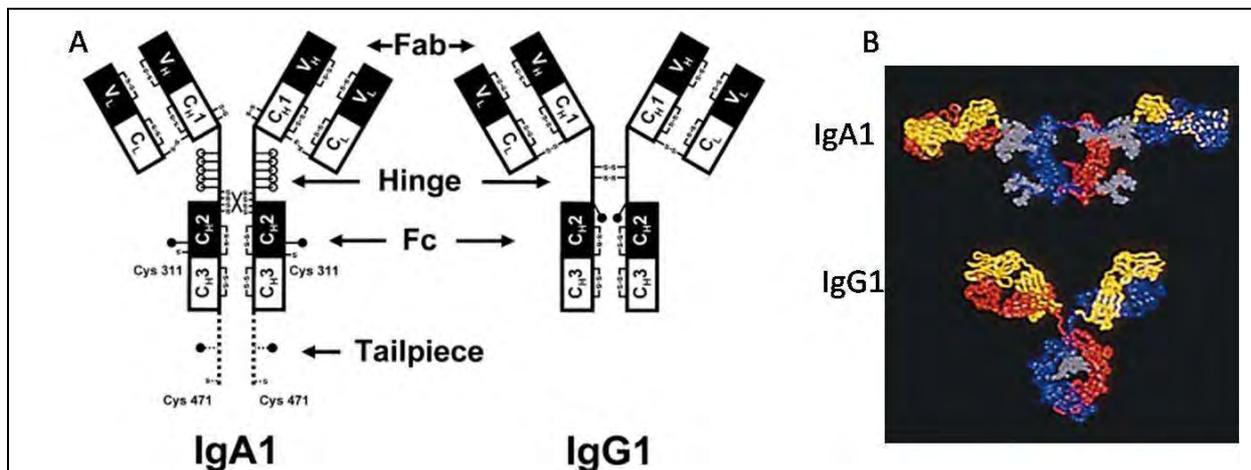
A- Représentation des deux isotopes d'IgA. Les chaînes lourdes sont représentées en bleu et les chaînes légères en vert

B- Les IgA sécrétoires sont composées de deux IgA de n'importe quel isotype. La chaîne J est représentée en jaune et le composant sécrétoire en noir. Des dimères d'IgA1 sont retrouvés dans la circulation et sont composés de deux molécules d'IgA1 relié de façon covalente à la chaîne J (en jaune)

#### 4.3.4.2 Structure des IgA1

La chaîne lourde des IgA1, formée par trois domaines constants :  $C\alpha_1$ ,  $C\alpha_2$  et  $C\alpha_3$  en plus du domaine  $V_H$ , possède une masse moléculaire plus importante que celle des IgG (60kDa contre 50kDa pour les IgG) du fait d'un nombre de glycosylations élevé, retrouvé dans la région constante (Kerr, 1990). En effet, les IgA1 sont des Ig très glycosylées et les sucres composent 6 à 8 % de leur masse moléculaire. Chacune des chaînes lourdes des IgA contient entre 2 et 5 glycosides N-liés qui sont sialylés dans 90-98% des cas. La région charnière des IgA1, située entre les domaines  $C\alpha_1$  et  $C\alpha_2$  et riche en prolines, sérines et tyrosines, est le site de 3 à 5 glycosylations du type O (Monteiro and Van De Winkel, 2003). Les O-glycosides, plus majoritairement retrouvés dans les IgA1, sont les Gal-GalNac et les Gal-GalNac monosialylés ou disialylés (Mattu et al., 1998); leur présence permet de purifier les IgA1 à l'aide de la jacaline, une lectine provenant d'un fruit tropical (*Atrocarpus spp*) qui est spécifique du  $\alpha$ -O-glycoside (gal $\beta$ 1-3 GalNac) des IgA1 (Aucouturier et al., 1988; Aucouturier et al., 1987; Aucouturier et al., 1992; Roque-Barreira and Campos-Neto, 1985).

Des expériences de diffusion de neutrons sur différentes immunoglobulines montrent que les IgA1 possèdent une structure en forme de « T » tandis que les autres Ig présentent une structure en forme de « Y », c'est-à-dire que leurs fragments Fab sont plus éloignés l'un de l'autre (Boehm et al., 1999) (Figure 26).

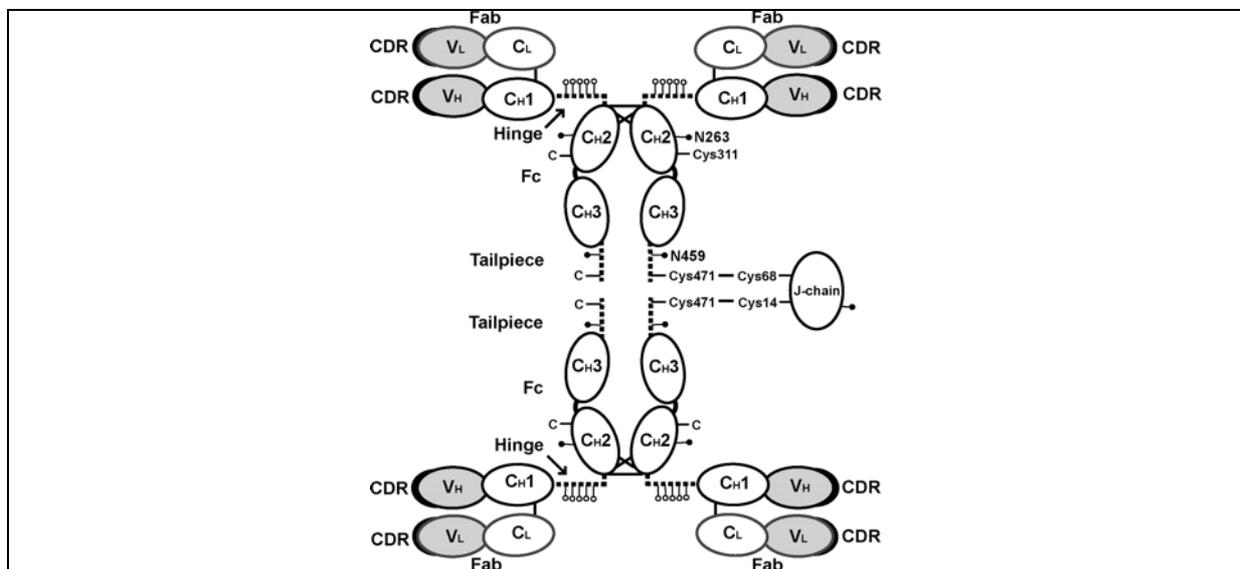


**Figure 26 : Différences structurelles entre les IgA1 et les IgG (d'après (Boehm et al., 1999))**

A- Représentation schématique de la structure des IgA1 et IgG1. Chaque chaîne lourde contient les domaines  $V_H$ ,  $C_H1$ ,  $C_H2$  et  $C_H3$  et chaque chaîne légère les domaines  $V_L$  et  $C_L$ . Les IgA1 diffèrent des IgG par la présence d'une région charnière (*Hinge*) plus longue et la présence en C-terminal d'une extension (*tailpiece*). Les oligosaccharides N-liés aux résidus sont représentés par des points noirs (•). Les O-glycosides sont représentés par le symbole o.

B- Représentation en ruban de la conformation des IgA1 et des IgG1/2. Les chaînes légères sont représentées en jaunes, les chaînes lourdes en rouge et bleu et les oligosaccharides en gris.

Les IgA sériques humaines sont majoritairement monomériques (80%) mais peuvent exister également sous forme dimérique. Des trimères et les tétramères d'IgA existent aussi, mais sont rares dans le sérum. Les IgA1 dimériques, contrairement aux IgA sécrétoires, possèdent une structure plane (Bonner et al., 2009; Bonner et al., 2008). Le domaine C $\alpha$ 3 des IgA possède une extension de 18 acides aminés (« tailpiece region »), également présente dans la chaîne lourde des IgM, dont l'avant-dernier acide aminé est une cystéine qui permet la formation de ponts disulfure entre les IgA et la chaîne J (pour *joining chain*). La chaîne J est une protéine de 16kDa et 137 acides aminés qui permet l'association entre plusieurs molécules d'IgA (Koshland, 1985) et, par conséquent, la formation de polymères d'IgA (Figure 27). Elle possède une région contenant 8 résidus cystéine, dont 6 sont impliqués dans la formation de ponts disulfure intra-chaîne. La chaîne J contient également un glycan N-lié. L'association entre les IgA, par l'intermédiaire de la chaîne J, se fait juste avant la sécrétion des dimères d'IgA par les plasmocytes (Johansen et al., 2000). La chaîne J a pendant longtemps été décrite comme absolument nécessaire à la formation de polymères (Krugmann et al., 1997) mais, par la suite, il a été retrouvé dans la circulation sanguine des dimères d'IgA dépourvus de chaîne J, mais associés à une forme soluble du récepteur aux fragments Fc des IgA (CD89) de façon covalente (van der Boog et al., 2002). Enfin, le catabolisme des IgA polymériques (IgAp) semble plus rapide que celui des IgA monomériques (Moldoveanu et al., 1990).



**Figure 27 : Représentation de la structure plane d'une IgA1 dimérique (Bonner et al., 2008)**

Une IgA1 dimérique est constituée de deux monomères d'IgA1 liés de façon covalente à la chaîne J. Deux ponts disulfures sont formés entre la cystéine en position 471 de chaque *tailpiece* et les résidus Cys14 ou Cys68 de la chaîne J.

#### 4.3.4.3 Rôle des IgA sériques

Les études sur la fonctionnalité des IgA1 concernent essentiellement les IgA1 monomériques dont le rôle reste encore mal connu. De façon générale, les monomères d'IgA sériques ne participent pas, ou très peu, à la protection de l'organisme contre la présence des agents infectieux comme le font les IgG et les IgM. Les IgA sériques sont essentiellement non-inflammatoires et joueraient un rôle de régulateur de la réponse immunitaire (Russell et al., 1997). En effet, les IgA sériques n'ont pas le site de liaison au composant C1q de la cascade du complément présent dans les IgG (Duncan and Winter, 1988) et ne sont donc pas capables d'activer la voie classique du complément (Morton et al., 1993). Par ailleurs, la capacité des IgA à activer la voie alterne du complément reste controversée. Pour certains auteurs, les IgA1 monomériques seraient capables de se fixer au C3, mais ne seraient pas capables de générer le C3b (Chuang and Morrison, 1997) contrairement aux IgA2 (Zhang and Lachmann, 1994).

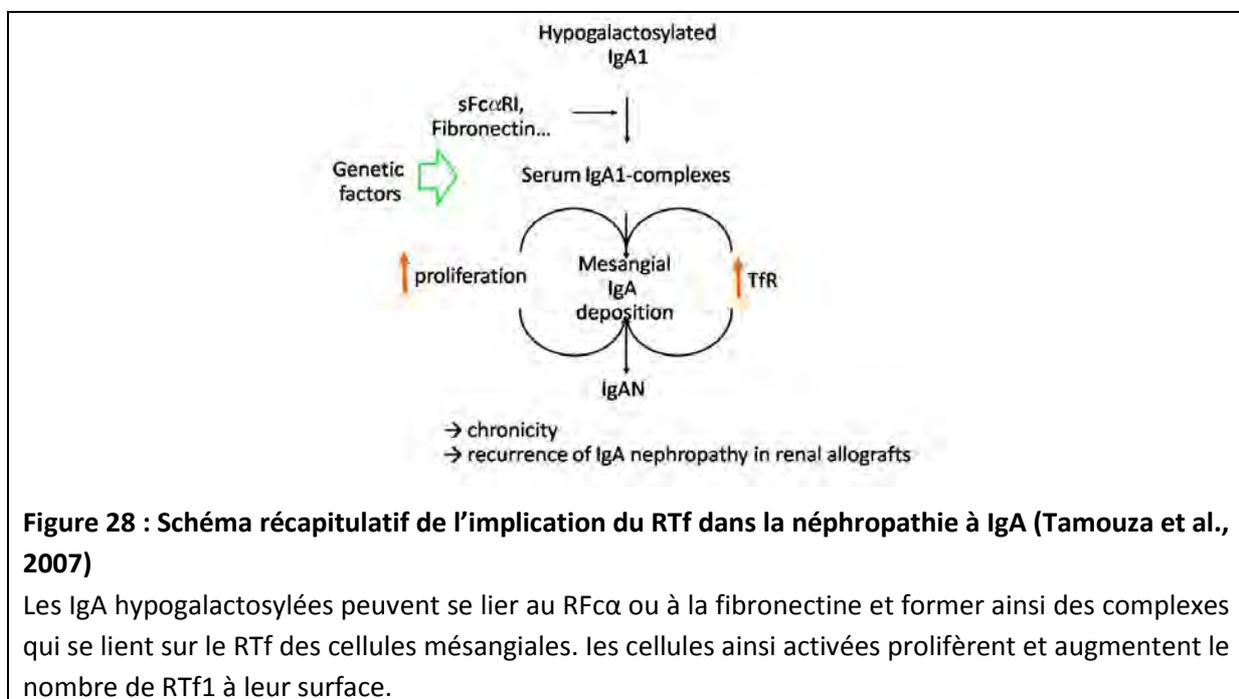
Plusieurs données corroborent l'hypothèse du rôle anti-inflammatoire des IgA sériques. Les IgA sériques sont capables d'inhiber la phagocytose et l'activation de la cascade du complément induites par les IgG, le chimiotactisme des monocytes et neutrophiles, la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) et la libération des cytokines (Griffiss and Goroff, 1983; Van Epps and Williams, 1976; Wilton, 1978). Par ailleurs, les études des déficits en IgA chez l'homme montrent que ces patients sont plus susceptibles à des allergies et à des maladies auto-immunes (Schaffer et al., 1991). Le rôle des IgA1 polymériques est très peu décrit, voire inconnu. La polymérisation des IgA a été décrite comme un facteur influant sur l'activité et la fonction des IgA1. En effet, la dimérisation/polymérisation des immunoglobulines augmente leur avidité pour leur antigène. Par exemple, les IgA monomériques sont moins efficaces dans la neutralisation des virus que les polymères d'IgA (Taylor and Dimmock, 1985). En outre, les polymères d'IgA se lient plus facilement au récepteur Fc $\alpha$ RI ou CD89 qui est le récepteur classique des IgA présents sur les cellules myéloïdes (Wines et al., 2001). D'autre part, il a été montré récemment que la réponse du Fc $\alpha$ RI aux IgA1 dépendait de l'agrégation du récepteur (Pasquier et al., 2005). En absence d'agrégation, la liaison du CD89 par des IgA1 monomériques ou un anticorps anti-CD89 inhibe les réponses activatrices des récepteurs aux IgG (Fc $\gamma$ R) et aux IgE (Fc $\epsilon$ RI). De façon contraire, l'agrégation du Fc $\alpha$ RI par un ligand multimérique (constitué d'IgA1 monomérique et d'anticorps anti-IgA1) stimule l'activation cellulaire. Il est à noter que les auteurs n'ont pas utilisé d'IgAp, ce qui ne permet pas de conclure formellement à une action activatrice de celles-ci. Enfin, la polymérisation des IgA a été impliquée dans plusieurs pathologies dont la néphropathie à IgA (NlgA) et le myélome. La N-IgA est la forme la plus fréquente de glomérulonéphrite, caractérisée par une inflammation des glomérules rénaux consécutive à des

dépôts d'IgA1p au niveau des mésangiums (Berger and Hinglais, 1968; D'Amico, 2000). Il est à noter que les IgA1p isolées chez ces patients présentent dans de nombreux cas des anomalies de glycosylation, notamment une hypogalactosylation ainsi qu'un ratio augmenté  $\lambda/\kappa$  de la chaîne légère. Il a été largement montré que ces anomalies structurelles jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de la maladie (Coppo and Amore, 2004; Novak et al., 2008). Des altérations structurelles des IgA1 ont aussi été mises en évidence dans le purpura de Henoch-Schönlein (Novak et al., 2007). Le myélome à IgA est caractérisé par une prolifération maligne monoclonale de plasmocytes sécréteurs. Les patients atteints de cette pathologie ont un taux élevé d'IgA dimériques et polymériques source d'hyperviscosité sanguine. Dans certains cas, les IgA polymériques présentent deux chaînes J par dimère (Brandtzaeg, 1975), tandis que d'autres n'en possèdent pas (Brandtzaeg, 1976). En opposition avec ces résultats, une étude récente montre que les IgA1 dimériques issues de myelome ne semblent pas différer structurellement des IgA1 dimériques physiologiques (Bonner et al., 2008).

#### 4.3.4.4 Caractérisation de la liaison RTf1/IgA1

La caractérisation du RTf1 en tant que récepteur aux IgA1 a été publiée la première fois en 2001 (Moura et al., 2001). Les auteurs ont identifié ce récepteur en générant des anticorps monoclonaux contre les protéines de surface cellulaire capables de se lier aux IgA. Cette même méthode avait été préalablement utilisée dans l'identification du CD89 comme un récepteur des IgA (Monteiro et al., 1992). Plus précisément, des protéines membranaires liant les IgA présentes dans les cellules de la lignée U937 (lignée monocyttaire humaine) ont été isolées par passage sur colonne d'IgA, après marquage des protéines de surface des cellules par l' $I^{125}$ . Parmi les protéines ainsi éluées, une protéine de 180kDa en conditions non réductrices et de 90kDa en milieu réducteur a été isolée. Un anticorps monoclonal spécifique de cette protéine, l'anticorps monoclonal A24 (IgG2bk, A24), a été généré par immunisation de souris. Après immunoprécipitation par les IgA1 et par A24, la protéine candidate a été testée par immunoempreinte à l'aide d'anticorps commerciaux anti-CD71/RTf. L'identité du RTf et la spécificité de l'A24 pour le RTf ont été démontrées en utilisant des transfectants exprimant le récepteur. Dans deux études ultérieures, A24 a été évalué en immunothérapie anti-tumorale dans la leucémie/ lymphome T de l'adulte liée au virus HTLV1 (ATL) et le lymphome du manteau, car celui-ci possède la capacité d'internaliser le RTf1 et de bloquer son recyclage à la surface cellulaire (Lepelletier et al., 2007; Moura et al., 2004b). Le RTf est capable de se lier aux IgA1 mais pas aux IgA2. La sélectivité du RTf pour les IgA1 indique la participation de la région

charnière des IgA1 dans le domaine des IgA interagissant avec le récepteur. D'autre part, il a été montré par immunofluorescence indirecte, utilisant des anticorps anti-IgA, que les formes polymériques des IgA1 se fixent plus fortement au RTf que les formes monomériques et induisent l'internalisation du récepteur (Moura et al., 2004a). Les pIgA1 semblent se lier au RTf1 et au RTf2. En effet, l'ajout de formes solubles du RTf1 et du RTf2, qui sont des protéines recombinantes produites dans le système d'expression baculovirus/cellules d'insecte, inhibe la fixation des pIgA1. Par contre, A24 ne se lie pas au RTf2 (données du laboratoire non publiées). L'implication de la liaison des pIgA1 au RTf a été étudiée dans physiopathologie de la néphropathie à IgA (N-IgA), essentiellement au niveau de la prolifération mésangiale qui est un évènement caractéristique de la phase initiale de la maladie. L'étude par immunohistochimie de tissus provenant de biopsies rénales a montré une expression accrue du RTf sur les cellules mésangiales (CM) des patients atteints de N-IgA (Moura et al., 2001). D'autre part, les pIgA1 de patients atteints de N-IgA se fixent plus sur le RTf que celles provenant de sujets sains, probablement du fait du rôle de la glycosylation dans l'interaction RTf/IgA. En effet, l'hypogalactosylation des pIgA1 semble accroître leur liaison au RTf (Moura et al., 2004a). Enfin, les pIgA1 permettent l'activation des cellules mésangiales car elles sont capables d'induire l'expression du RTf à leur surface ainsi que leur prolifération. Ce système de rétrocontrôle positif semble jouer un rôle dans la chronicité de la maladie (Figure 28) (Moura et al., 2005).

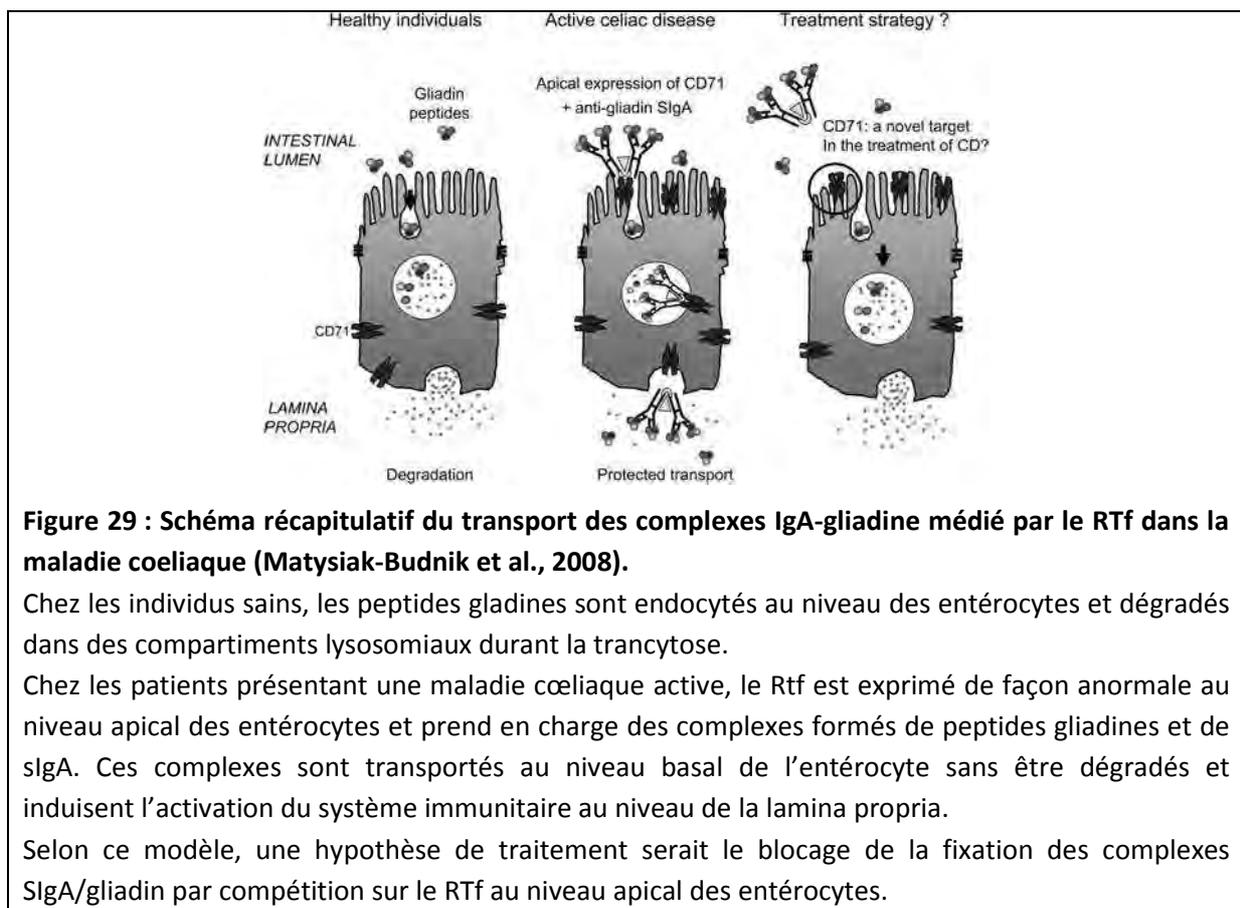


**Figure 28 : Schéma récapitulatif de l'implication du RTf dans la néphropathie à IgA (Tamouza et al., 2007)**

Les IgA hypogalactosylées peuvent se lier au RFcα ou à la fibronectine et former ainsi des complexes qui se lient sur le RTf des cellules mésangiales. Les cellules ainsi activées prolifèrent et augmentent le nombre de RTf1 à leur surface.

Récemment, la liaison IgA1/RTf a été impliquée dans une autre pathologie auto-immune, la maladie cœliaque (Matysiak-Budnik et al., 2008). La maladie cœliaque est une entéropathie

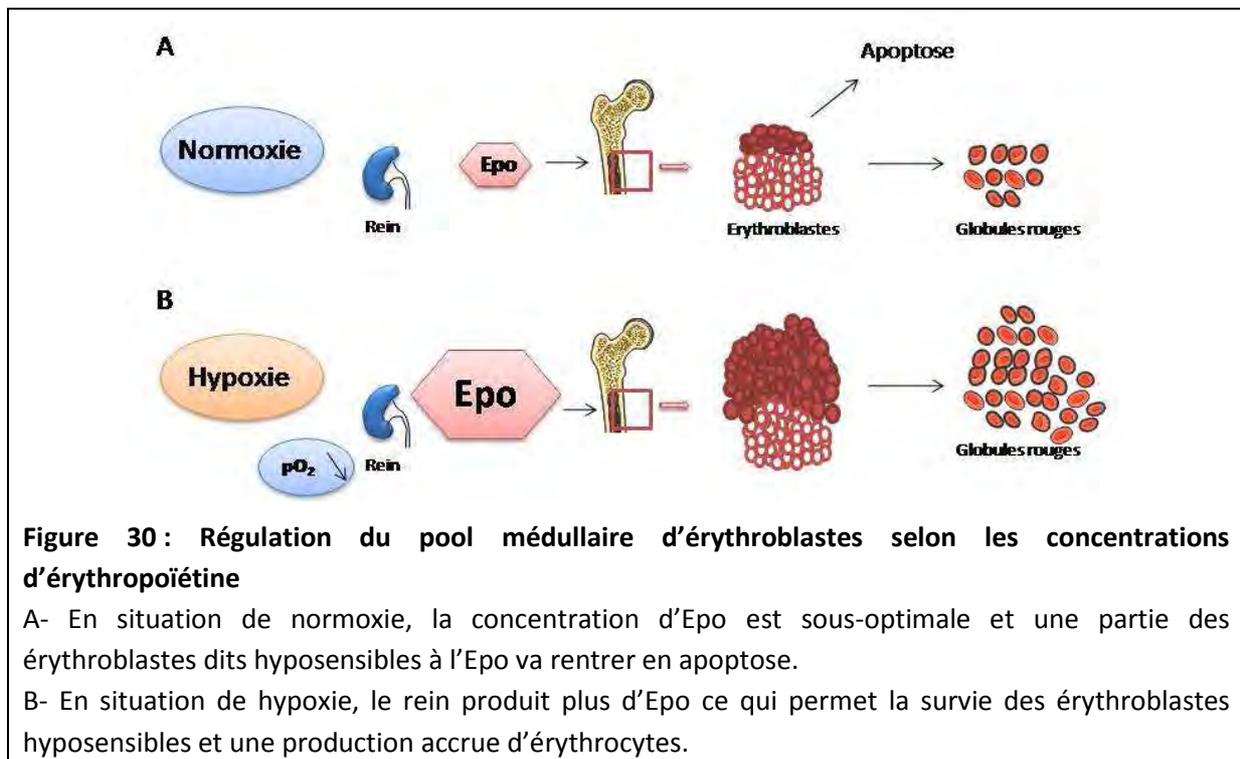
inflammatoire induite par les prolamines dérivées du gluten chez des individus généralement génétiquement prédisposés. L'absorption de certaines prolamines, nommées gliadines, provoque une activation accrue des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et un relargage de cytokines pro-inflammatoires (principalement l'IL1-5) ayant pour conséquence une destruction des villosités de la paroi intestinale. L'équipe de Martine Heyman a montré que le RTf1 était anormalement présent à la membrane apicale des entérocytes de ces patients et permettait la prise en charge de complexes comprenant des IgA sécrétoires et des peptides gliadines non dégradés de la membrane apicale à la membrane basale (Figure 29).



En résumé, la liaison des pIga1 au RTf est maintenant bien caractérisée et présente des implications physiopathologiques dans au moins deux maladies auto-immunes. Cependant, les conséquences physiologiques de cette interaction restent, à l'heure actuelle, inconnues.

## Problématique et objectifs de l'étude

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'érythropoïèse est un lignage finement régulé au niveau cellulaire et moléculaire afin de produire un nombre de globules rouges adapté aux situations normales et pathologiques. En effet, en cas de stress (anémie aigue d'origine non centrale, hypoxie..), la production d'érythrocytes peut être multipliée jusqu'à sept afin de rétablir des paramètres hématologiques normaux. C'est pourquoi, il existe au niveau médullaire un large pool de progéniteurs et de précurseurs érythroïdes dont une partie va, soit rentrer en apoptose en condition physiologique, soit proliférer et se différencier en érythrocytes en cas de stress (Figure 30).



**Figure 30 : Régulation du pool médullaire d'érythroblastes selon les concentrations d'érythropoïétine**

A- En situation de normoxie, la concentration d'Epo est sous-optimale et une partie des érythroblastes dits hyposensibles à l'Epo va rentrer en apoptose.

B- En situation de hypoxie, le rein produit plus d'Epo ce qui permet la survie des érythroblastes hyposensibles et une production accrue d'érythrocytes.

Les érythroblastes qui survivent et se différencient en conditions physiologiques, sont dits hypersensibles à l'Epo, mais les facteurs influant sur cette hypersensibilité sont à l'heure actuelle inconnus. D'autre part, des plasmocytes à IgA sont retrouvés dans la moelle osseuse, sans pour cela que leur action *in situ* soit très détaillée. Sachant que le récepteur de la transferrine a pour ligand les IgA et que les érythroblastes sont les cellules physiologiques qui expriment le plus densément ce récepteur, les objectifs de ce travail étaient les suivants :

- Est-ce que les plgA1 peuvent se lier au RTf1 des précurseurs érythroïdes et quelles sont les conséquences physiologiques de cette interaction ?
- Quelles sont les mécanismes moléculaires consécutifs à cette liaison ?
- Dans quel contexte physiopathologique les plgA1 jouent-elles un rôle dans l'érythropoïèse ?
- Existe-t-il des mécanismes de régulation du taux de plgA1, notamment lors de l'hypoxie ?

Les éléments de réponse sont présentés dans l'article suivant, actuellement soumis à publication.

# Résultats

## **Polymeric IgA1 controls erythroblast proliferation and accelerates erythropoiesis recovery in anemia**

Séverine Coulon<sup>1</sup>, Pamella Huey Mei Wang<sup>2,3</sup>, Damien Grapton<sup>1,2,3</sup>, Celine Callens<sup>1</sup>, Michaël Dussiot<sup>1</sup>, Julie Vandekerckhove<sup>1</sup>, Houda Tamouza<sup>2,3</sup>, Meetu Tiwari<sup>2,3</sup>, Yael Zermati<sup>1</sup>, Jean-Antoine Ribeil<sup>1</sup>, Kamel Djedaini<sup>4</sup>, Geneviève Courtois<sup>1</sup>, Bertrand Arnulf<sup>5,6</sup>, Marie Alexandra Alyanakian<sup>7,8</sup>, Patrick Mayeux<sup>9,10,11</sup>, Catherine Lacombe<sup>9,10,11</sup>, Marc Benhamou<sup>2,3</sup>, Michel Cogné<sup>12</sup>, Renato C. Monteiro<sup>2,3\*</sup>, Olivier Hermine<sup>1,13\*</sup> and Ivan C. Moura<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>CNRS UMR 8147, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Hôpital Necker, Paris, France

<sup>2</sup>INSERM, U699, Paris, France

<sup>3</sup>Faculté de Médecine and Université Denis Diderot Paris VII, Paris, France

<sup>4</sup>Clinique Geoffroy Saint-Hilaire, Paris, France

<sup>5</sup>Department of Immuno-Hematology, Faculté de Médecine and Université Denis Diderot Paris VII, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint Louis, Paris, France

<sup>6</sup>Laboratoire EA3963, Faculté de Médecine and Université Denis Diderot Paris VII, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint Louis, Paris, France.

<sup>7</sup>INSERM, U580, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Hôpital Necker, Paris, France

<sup>8</sup>Laboratoire d'Immunologie Biologique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Paris, France

<sup>9</sup>Institut Cochin, Département d'Hématologie, Paris, France

<sup>10</sup>INSERM, U567, Paris, France

<sup>11</sup>UMR-S 8104, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Paris, France

<sup>12</sup>Université de Limoges; CNRS UMR 6101, France

<sup>13</sup> Service d'Hématologie clinique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Paris, France

Address correspondence to: Ivan Cruz Moura, Ph.D., INSERM U699, Immunopathologie rénale, récepteurs et inflammation, Faculté de Médecine Xavier Bichat. 16, Rue Henri Huchard. F-75870 Paris Cedex 18 Paris, France. Phone : 33-1-5727-730 1; FAX : 33-1-5727-7661; e-mail : [ivan.moura@inserm.fr](mailto:ivan.moura@inserm.fr), to: Olivier Hermine, M.D., Ph.D., Centre National de la Recherche Scientifique-Unité Mixte de Recherche 8147, Université Paris V. René Descartes, Hôpital Necker, 161 rue de Sèvres, 75015 Paris, France. Phone: 33-1-4449-0675; Fax: 33-1-4449-0676; e-mail: [hermine@necker.fr](mailto:hermine@necker.fr) or to Renato Monteiro, M.D., Ph.D., INSERM U699, Immunopathologie rénale, récepteurs et inflammation, Faculté de Médecine Xavier Bichat. 16, Rue Henri Huchard. F-75870 Paris Cedex 18 Paris, France. Phone : 33-1-5727-730 1; FAX : 33-1-5727-7661; e-mail : [renato.monteiro@inserm.fr](mailto:renato.monteiro@inserm.fr).

# Summary

Anemia is a major complication in patients suffering from Chronic Kidney Disease (CKD) and Cancer<sup>1,2</sup>. Erythropoietin (Epo) is the main cytokine controlling terminal erythropoiesis<sup>3</sup> and its administration usually restores hematocrit and hemoglobin levels in anemic patients<sup>4</sup>. We aimed to identify factors modulating erythroblast sensitivity in physiological conditions. Erythroblasts highly express the transferrin receptor (CD71/TfR1), previously identified as an IgA1 receptor<sup>5</sup>. Here we show that the polymeric IgA1 (pIgA1) level was high in human bone marrow and increased in serum under hypoxic stress. TfR1-bound pIgA1 rescued the growth and clonogenic potential of erythroblasts under suboptimal Epo concentrations. The molecular mechanism involved TfR1-dependent magnification of Epo signaling through activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K/AKT) signaling pathways, but not the Epo-specific JAK2/STAT5. In humanized mouse models, pIgA1 accelerated stress erythropoiesis induced by acute haemolysis. Therefore, pIgA1/TfR1 signaling modulates erythroblast sensitivity to growth factors by decreasing cell activation threshold. This unveils the role of pIgA1 as a positive regulator of erythropoiesis in both physiological and pathological situations. Targeting this pathway could provide alternative approaches to treat anemia and in particular in Epo hypo-responsive patients

## Results and Discussion

Erythropoiesis relies on the commitment of hematopoietic stem cells towards erythroid progenitors and precursors. Stem cell factor (SCF) and erythropoietin (Epo) are absolutely required for proliferation and survival of erythroid cells<sup>6,7</sup>. Epo is crucial to the end stage of erythropoiesis allowing terminal differentiation<sup>3</sup>, which is dependent on caspase-3 activation<sup>8</sup>. In the absence of Epo, late erythroblasts undergo apoptosis following the cleavage of the GATA-1 transcription factor by caspase-3. Recently, we reported that this mechanism is regulated by Hsp70, which protects GATA-1 against caspase-3 cleavage<sup>9</sup>.

Another feature of erythroid precursors is their absolute requirement for iron to support hemoglobin production. Transferrin receptor 1 (CD71/TfR1) is essential for erythropoiesis<sup>10</sup> and the investigation of TfR1 function has been focused on its undeniable role in iron metabolism. However, recent data demonstrate that TfR1 is a multi-ligand receptor that participates in a wide array of cellular functions<sup>11-13</sup>. We recently identified TfR1 as a type A1 immunoglobulin (IgA1) receptor<sup>5</sup>. IgA1 binding to TfR1 depends on both the size and the glycosylation of IgA1 and plays a pivotal role in IgA nephropathy (IgAN) and celiac disease (CD)<sup>5,14,15</sup>.

Given that IgA1<sup>+</sup> plasma cells are abundant in the BM<sup>16</sup>, where erythropoiesis takes place, and that TfR1 is a receptor highly expressed on erythroblasts<sup>17</sup>, we hypothesized that IgA1 could play a role in erythropoiesis. On human BM aspirates, polymeric (p) IgA1 bound to TfR1<sup>high</sup> erythroid glycoprotein A<sup>+</sup> (GPA) cells (Supplemental Figures 1A and 1B) but not GPA<sup>+</sup> TfR1<sup>neg</sup> cells (Supplemental Figure 1B). As expected pIgA1 bound CD11b<sup>+</sup> cells, which express CD89 (Supplemental Figure 1A)<sup>18</sup>. pIgA1 binding was also observed in cord blood-derived erythroid cells (CD36<sup>+</sup> cells) and an erythroid cell line (Supplemental Figure 1C), which express TfR1 as the only IgA receptor (Supplemental Figures 2A and 2B). TfR1 (but not CD89) was immunoprecipitated with pIgA1, but not with IgG, from UT-7 cell lysates (Supplemental Figure 2C). Pre-incubation of erythroid cells with soluble TfR1, or with an anti-TfR1 which induces TfR1 internalization and degradation (Supplemental Figure 2D)<sup>19,20</sup>, prevented pIgA1 binding (Supplemental Figure 2E). Therefore, pIgA1 binds erythroid cells through TfR1.

To examine the role of pIgA1 in erythropoiesis, human CD34<sup>+</sup> cells from cord blood were cultured with concentrations reflecting saturating and suboptimal levels of SCF and Epo (which induced 50% apoptosis in liquid cultures (Supplemental Figure 3)) in the presence of pIgA1 or IgG (as a control). As expected, in the absence of growth factors, pIgA1 did not support the growth of erythroblasts (data not shown). At a saturating concentration of growth factors, no difference in the presence of pIgA1

or IgG was observed in the number of BFU-E-derived colonies (Figure 1A) and in the growth of erythroblasts (Figure 1B and 1C). At suboptimal concentrations of SCF with either saturated or suboptimal Epo levels, a significantly lower number of BFU-E-derived colonies was observed (Figure 1A). The addition of plgA1 (but not IgG) to the cultures significantly increased the number of BFU-E colonies (Figure 1A). plgA1 also allowed the rescue of erythroblasts cultured with suboptimal Epo concentrations to a level similar to that of cultures containing a saturating concentration of the growth factors (Figures 1B and 1C) and inhibited apoptosis by preventing the activity of caspases (Supplemental Figure 4). The time frame when plgA1 was effective coincided with the peak of TfR1 expression (Supplemental Figure 5).

To identify the molecular pathways triggered by plgA1 on erythroid cells, growth factor-starved cells were stimulated by physiological concentrations of Epo, SCF or purified myeloma-derived plgA1 (0.2 mg/ml, which corresponds to the physiological concentration of plgA1 in the serum). The MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways, but not the STAT5 pathway, were induced by plgA1, as detected by the phosphorylation of their molecular effectors (Figure 1D and Supplemental Figures 6A and 6B). This plgA1-induced activation of signal effectors did not lead to cell proliferation by itself (not shown), but sensitized the erythroblasts to stimulation by growth factors. Indeed, during experiments in which cells were activated with increasing concentrations of SCF or Epo, the addition of plgA1 enhanced the phosphorylation of ERK1/2 and AKT (Figures 1E and 1F). TfR1 targeting by anti-TfR1 (mAbA24)<sup>19</sup> also induced a transient phosphorylation of ERK1/2 and AKT (Figure 1G) and magnified the MAPK/ERK signaling pathway and that of PI3K/AKT, induced by SCF and Epo (Supplemental Figures 6C and 6D). In addition, the TfR1 natural ligand (Fe-transferrin) induced phosphorylation of AKT, but not of ERK1/2 (Figure 4D) and magnified Epo-dependent PI3K/AKT signaling (Figure 1H).

We further explored the role of plgA1 in erythropoiesis *in vivo* since human plgA1 bound TER-119<sup>+</sup>/TfR1<sup>+</sup> but not TER-119<sup>+</sup>/TfR1<sup>-</sup> murine erythroblasts (Supplemental Figure 7A). For this purpose we used two mouse models : *i-* human (h) IgA1 knock-in ( $\alpha$ 1KI) mice constitutively producing hlgA1 or *ii-* passive transfer through intravenous injection of hlgA1 in immunodeficient mice.  $\alpha$ 1KI mice carry a homozygous mutation of the IgH heavy chain locus, obtained through replacement of the mouse switch  $\mu$  region ( $S_{\mu}$ ) by the human C $\alpha$ 1 gene. In these mice, hlgA1 is constitutively produced and is found in the circulation in concentrations ranging from 0.5 to 1mg/ml (Cogné *et al*, manuscript under revision).

Stress erythropoiesis is well studied in mice and mainly occurs in the spleen<sup>21</sup>.  $\alpha$ 1KI mice or littermate (LT) controls were subjected to phenylhydrazine (PHZ) treatment which induces a transient hemolytic anemia followed by a compensatory stress erythropoiesis. In  $\alpha$ 1KI mice, the

presence of pIgA1 accelerated the erythropoietic recovery from anemia (Figure 2A), enhanced spleen TER-119<sup>+</sup>/TfR1<sup>+</sup> erythroblasts and stress-induced BFU-E (Figures 2B and C and Supplemental Figure 7B) which was accompanied by a splenomegaly (Supplemental Figure 7C). Under steady-state conditions, human pIgA1 injection in NOD-SCID mice increased the number of late BFU-E colonies (Supplemental Figure 8A) and the percentage of TER-119<sup>+</sup>/TfR1<sup>+</sup> erythroblasts in BM (Supplemental Figure 8B) without changes in the hematocrit, erythrocytes and reticulocytes number (Supplemental Figures 8C-E), indicating that the negative regulation of erythropoiesis occurs even in the presence of pIgA1 during normal erythropoiesis. However, erythropoietic recovery from PHZ-induced anemia was accelerated after pIgA1 transfer in NOD-SCID mice with a significant increase in the hematocrit, reticulocytes and red blood cells populations (Figures 2D-F). Spleen BFU-E and TER-119<sup>+</sup>/TfR1<sup>+</sup> erythroblasts numbers were also increased in pIgA1-treated mice over controls (Figures 2G and 2H).

IgA deficiency (IgA-D) is the most frequent primary immunodeficiency in humans<sup>22</sup> and serum from IgA-D patients constitutes a valuable tool to evaluate the contribution of IgA in erythropoiesis. When compared with serum from healthy donors, serum from IgA-deficient patients did not promote the proliferation of erythroblasts (Figure 3A). pIgA1, but not IgG, added to the serum from IgA-D patients rescued the growth of erythroblasts and protected them from apoptosis (Figures 3A and 3B). Likewise, the circulating Epo level was found significantly increased in IgA-D patients (Figure 3C). We further used IgA myeloma serum to evaluate their capacity to modulate erythroblasts proliferation. When serum from patients were added to erythroblasts, the only biological parameter that correlated with the growth of CD36<sup>+</sup> cells was the IgA1 multimerization status (Supplemental Figures 9A-D). Evaluating the level of pIgA1 in different biological fluids from healthy subjects, we observed that pIgA1 fraction was enriched in BM compared with serum (Figures 4A and B). In addition, the growth of erythroblasts was enhanced in cultures where the pIgA1/mIgA1 ratio was increased (Figure 4C).

The Epo level is tightly regulated by tissue oxygenation through the hypoxia-inducible factor (HIF) transcriptional complex<sup>23</sup>. During hypoxic stress, the Epo level increases to recruit erythroid progenitors/precursors within the BM to produce more reticulocytes. To examine whether hypoxia could modulate the production of pIgA1, we compared the level of pIgA1 in normal subjects and patients who were chronically hypoxic (patients with chronic obstructive pulmonary disease or obstructive sleep apnea). The serum from these patients was enriched with pIgA1 (Figures 4D and E) suggesting that the pIgA1 level can be modulated by the oxygen level.

We demonstrate that pIgA1 can prime erythroblasts for survival and proliferation under suboptimal concentrations of either Epo or SCF. We propose that pIgA1 is a positive regulator of erythropoiesis

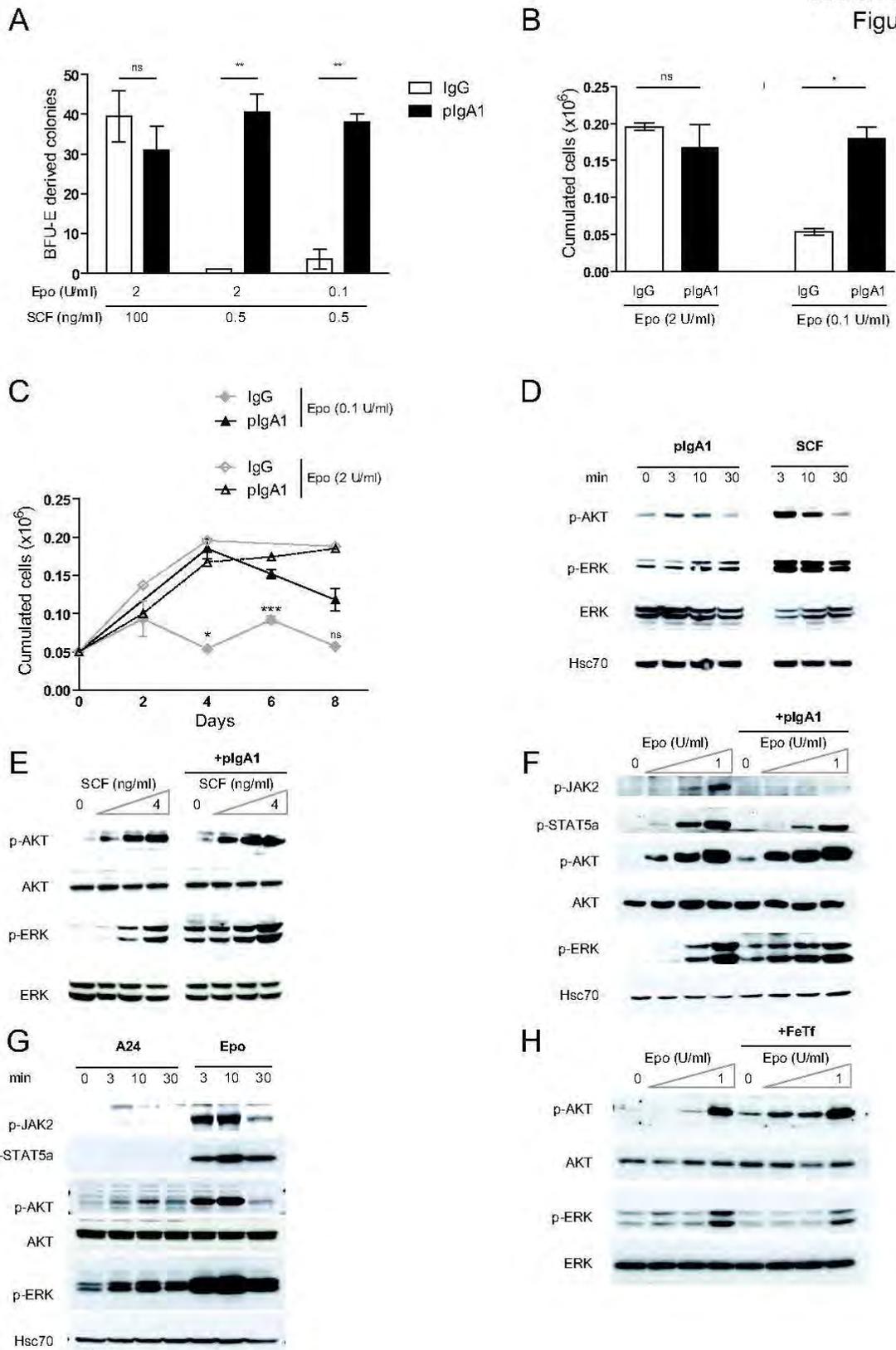
that modulates the sensitivity of progenitors to growth factors. Moreover, the pIgA1 level is increased by hypoxia, whereas the Epo level is increased in IgA-deficient patients, suggesting compensatory mechanisms indicative of pIgA1 involvement in erythropoiesis. This mechanism of regulation would allow for a fine-tuning of the cellular response to changes in the cellular environment such as hypoxia. Our data unveil a new function for type A1 immunoglobulin that is unrelated to its role in the immune system. This complex system may also intervene under pathological conditions where the Epo level is decreased, such as chronic kidney diseases.

Altogether, the present data unveil a new function for TfR1 that is directly involved in cell proliferation, independent of its role in iron metabolism. Schmidt *et al.* have recently described another function of TfR1, the sequestration of HFE, which is crucial to the TfR2 signaling pathway and the induction of hepcidin expression<sup>11</sup>. We propose that in addition to these functions, TfR1 controls the activation status of the cell by modulating its sensitivity to growth factors. The signaling basis for this functional heterogeneity may rely on the manner by which receptor is engaged, *i.e.*, monovalent vs multivalent binding (*e.g.*, triggering by pIgA1). Therefore, the array of TfR1 functions is growing and TfR1 should now be considered not only as a cargo molecule for iron uptake, but also as a receptor that fulfills major signaling functions involved in cell activation. Targeting TfR1-dependent pathways could be a new alternative to bolster erythropoiesis in anemic patients.

In conclusion, the discovery of the signals triggered by the interaction between TfR1 and pIgA1 sheds light on the molecular mechanisms underlying the heterogeneous sensitivity of erythroblast progenitors to Epo and SCF<sup>24</sup>. This system is regulated by hypoxia and could be critical to maintain red blood cell production at a constant level in both steady-state and stress situations (Supplemental Figures 10A and 10B).

# Figures

Coulon et al.  
Figure 1



**Figure 1: Effect of plgA1 on erythroblast proliferation**

(A) Semisolid cultures for the detection of BFU-E in the presence or absence of plgA1. CD34+ progenitors from human cord blood were cultured for 16 days in methyl cellulose medium supplemented with IL-3, IL-6, GM-CSF and suboptimal or saturating concentrations of SCF (0.1 and 100 ng/ml) and Epo (0.2 and 2 U/ml) in the presence of 0.2 mg/ml plgA1 (black bars) or IgG (empty bars). The data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n=3) \*\*p < 0.01.

(B) CD36+ erythroid cells (generated from CD34+ cord blood cells as described in Material and Methods) were cultured in the presence of IL-3 (10 ng/ml), SCF (100 ng/ml) and Epo (0.1 or 2 U/ml) in the presence of plgA1 (black bars) or IgG (empty bars). The number of viable cells at day four is shown. The data are presented as the mean  $\pm$  SEM \*p < 0.05.

(C) Kinetics of the proliferation of CD36+ cells (cultured as in B) with a suboptimal (closed symbols) or saturating (open symbols) Epo concentration in the presence of plgA1 (triangles) or IgG (diamonds). The data are presented as the mean  $\pm$  SEM. \* p<0.05; \*\*\* p<0.001 (n=3 each group).

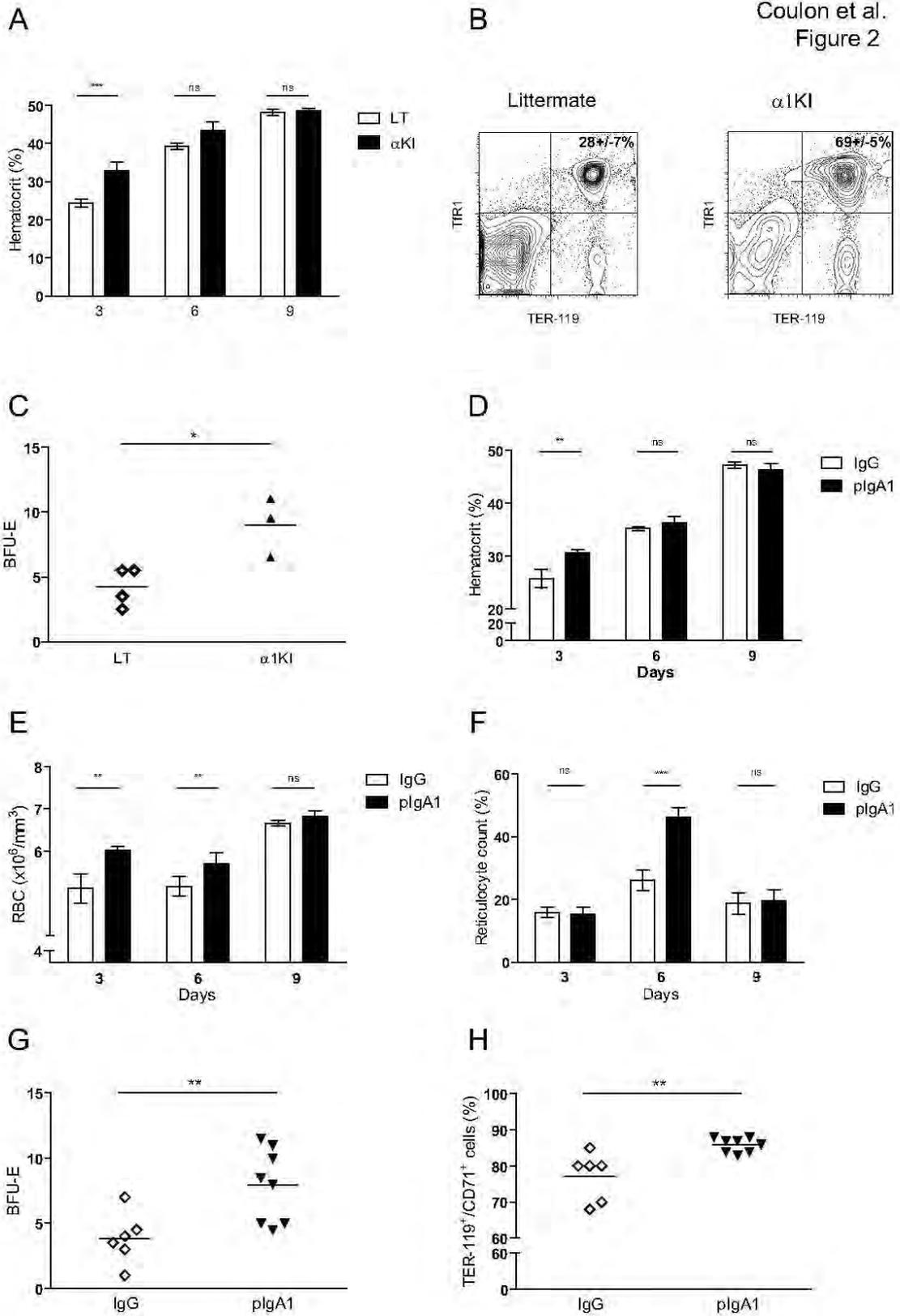
(D) plgA1 or SCF induces time-dependent phosphorylation of AKT and ERK1/2 in UT-7 cells.

UT-7 cells ( $2 \times 10^6$  cells/condition) were starved of growth factors for 18 hours and incubated with SCF (0.5 ng/ml) or plgA1 (0.2 mg/ml) for 3, 10 and 30 min. The phosphorylation of AKT (Ser 473) and ERK1 (Thr 202 and Tyr 204 residues), ERK2 (Thr 185 and Tyr 187) were examined by immunoblotting whole cell lysates. ERK1/2 and Hsc70 were used as a loading control.

(E and F) UT-7 cells were deprived of Epo and stimulated for 3 min with various concentrations of SCF (0.16 to 4 ng/ml) (E) or Epo (0.03 to 1 U/ml) (F) in the presence or absence of plgA1. The total protein expression of the specific proteins, as well as the phosphorylation of AKT and ERK1/2, was evaluated by immunoblot. The data are representative of three independent experiments.

(G) Treatment with the anti-human Tfr1 antibody (mAb A24) induces cell activation. Time-dependent stimulation of UT-7

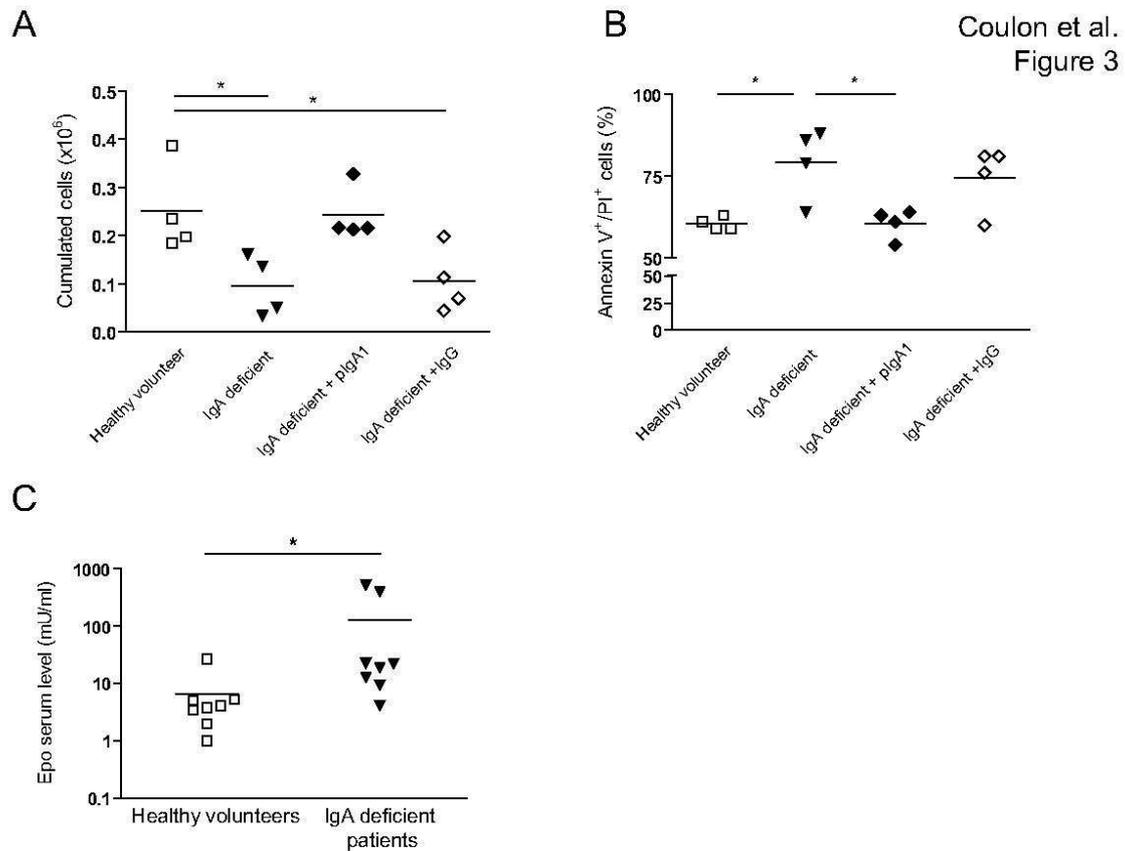
cells in the presence of A24 (10  $\mu$ g/ml) or Epo (0.5 U/ml). (H) Stimulation of UT-7 cells by Epo (0.03–1 U/ml) in the presence or absence of Fe-Tf (150  $\mu$ g/ml). UT-7 cells were deprived of Epo and Fe-Tf (in the presence of soluble iron) for 18 hours and stimulated for 3 min with various concentrations of Epo in the presence or absence of Fe-Tf. The total protein expression, as well as the phosphorylation of AKT and ERK1/2, was evaluated by immunoblotting. The data are representative of three independent experiments.



**Figure 2: Role of human plgA1 in mouse erythropoiesis**

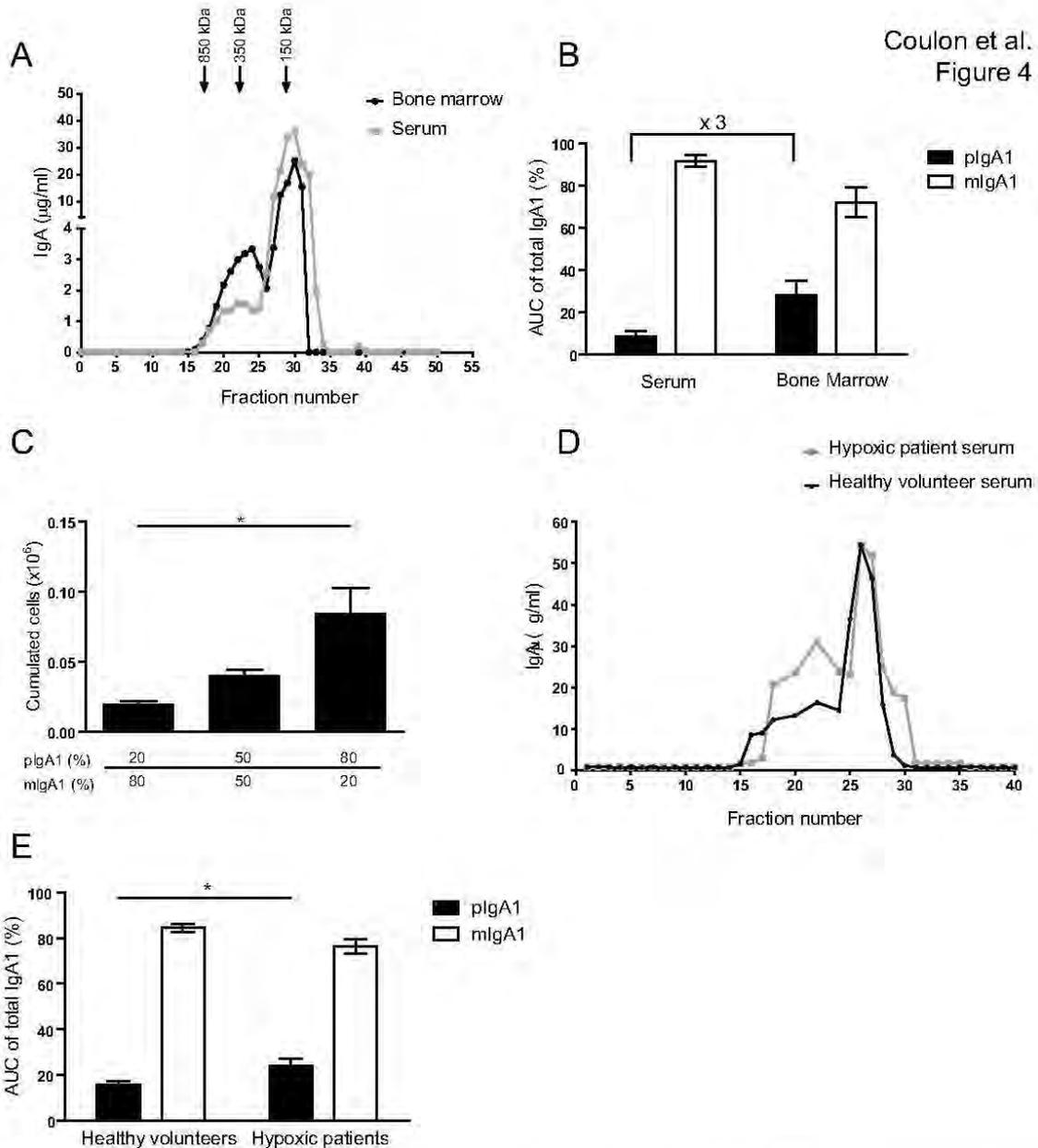
(A-C) Mice were subjected to PHZ-induced hemolytic anemia (injections on day 0 and 1) and erythropoietic response to acute anemia was evaluated in  $\alpha$ 1KI mice (n=3) and littermate controls (n=5). Hematocrit level of  $\alpha$ 1KI mice (black bars) and littermate controls (empty bars) was evaluated at days 3, 6 and 9 (A). The percentage of TER-119+/GPA+ cells in the spleen was evaluated by immunofluorescence (B). The number of spleen erythroid progenitors was determined using a methyl cellulose assay for BFU-E detection (C). The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM (A and B) or as data obtained from individual mice (C). The bars represent the means. Black triangles ( $\alpha$ 1KI mice) and white diamonds (littermate controls), \*p < 0.05.

(D-H) NOD/SCID mice were subjected to PHZ-induced hemolytic anemia (injections on day 0 and 1) and treated with human IgG or polymeric IgA (400  $\mu$ g every two days intravenously) over 9 days as indicated. The erythropoietic response to acute anemia was evaluated in plgA1-treated mice (black bars) and IgG-treated mice (empty bars). The hematocrit level (D), red blood cell concentration (E) and reticulocyte percentage (F) were analyzed. (G) The number of erythroid progenitors in the spleen was determined using a methyl cellulose assay for BFU-E detection. (H) The percentage of TER-119+/GPA+ cells in the spleen was evaluated by immunofluorescence. The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM (D-F) or as data obtained from individual mice (G and H; the bars represent the mean). \*p < 0.05; \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 (n=6 to 8 in each group).



**Figure 3: Erythrost growth is impaired in the absence of IgA and Epo levels are enhanced in IgA-D patients.**

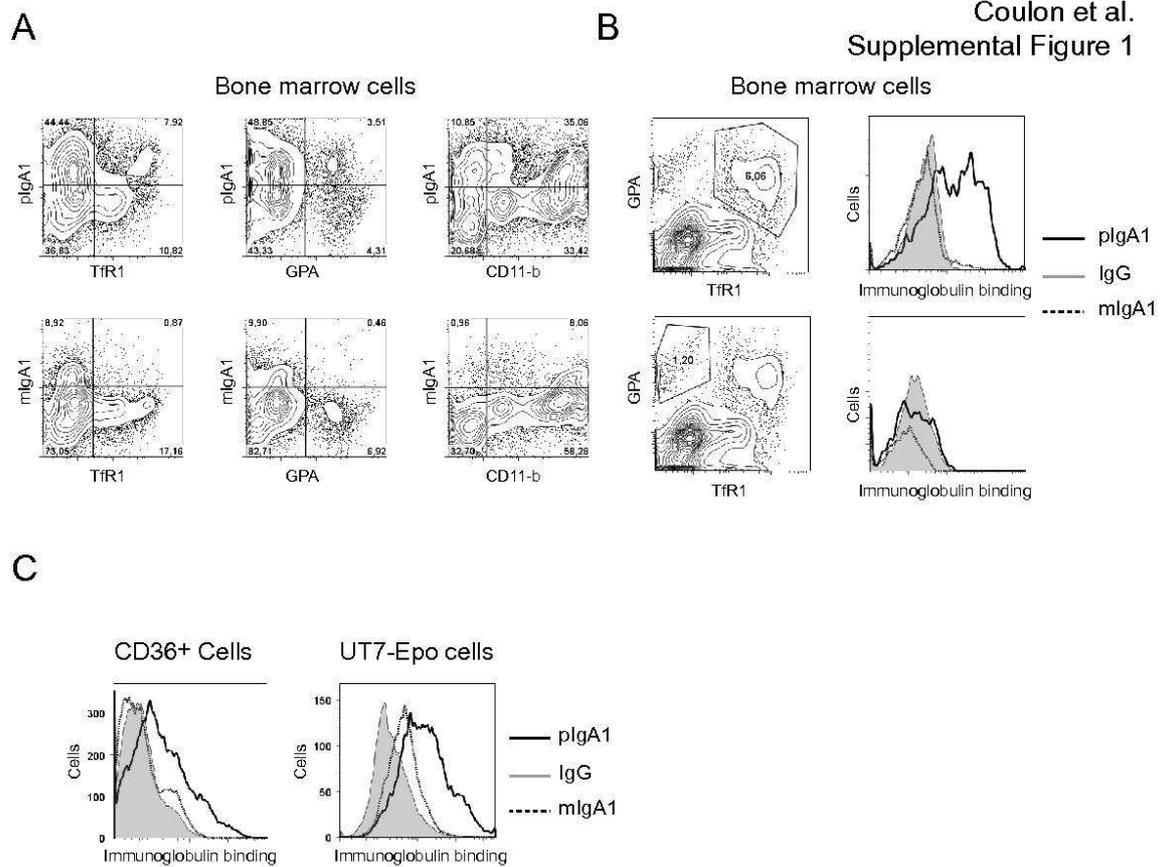
In vitro cultures of erythroid precursors were performed in the presence of serum from IgA-deficient patients, which was supplemented with pIgA1 or IgG, and healthy subjects. CD36<sup>+</sup> erythroid progenitors were purified and cultured in the presence of 5% human serum (instead of serum-free medium) supplemented with IL-3, SCF and a suboptimal concentration of Epo (0.1 U/ml). (A) The number of cells was quantified at day 4 using trypan blue exclusion (n=3 for each condition), and (B) survival was assessed using annexin V/propidium iodide staining. (C) The serum Epo level from patients with IgA-D and healthy subjects was determined by ELISA. The bars represent the mean. \*p < 0.05 (n=8 in each group).



**Figure 4: pIgA1 is present at a high level in human BM and is induced in serum during hypoxia**

(A) Five-hundred microliters of serum (gray line) or supernatant of BM aspirates (black line) from healthy volunteers was fractionated by gel filtration. The fractions were analyzed for IgA content by ELISA, as described under Material and Methods. The molecular mass of the calibrated column is indicated at the top of the Figure. (B) The area under curve (AUC) of each IgA1 fraction (polymeric and monomeric) was calculated and is expressed as the percentage of AUC of the combined IgA1 fractions in the corresponding sample. Black bars: polymeric IgA1; empty bars: monomeric IgA1. The results are expressed as the mean + SEM (n=4). (C) The impact of increased pIgA1 ratio on the growth of erythroid precursors. The cells were cultured as described in Figure 2B with IgA1 containing an increasing proportion of the polymeric form. The cells were counted at day 4. (D) Five-hundred microliters of serum from healthy volunteers (gray line) or hypoxic patients (black line) was fractionated by gel filtration. The fractions were analyzed for their IgA content by ELISA, as described under Material and Methods. (E) The AUC of each IgA1 fraction (polymeric and monomeric) was calculated and is expressed as the percentage of the AUC of the combined IgA1 fractions in the corresponding sample. Black bars: polymeric IgA1; empty bars: monomeric IgA1. The results are expressed as the mean + SEM (n=4). \*p < 0.05.

# Supplementary Figures



**Supplementary Figure 1: pIgA1 binds human erythroid cells**

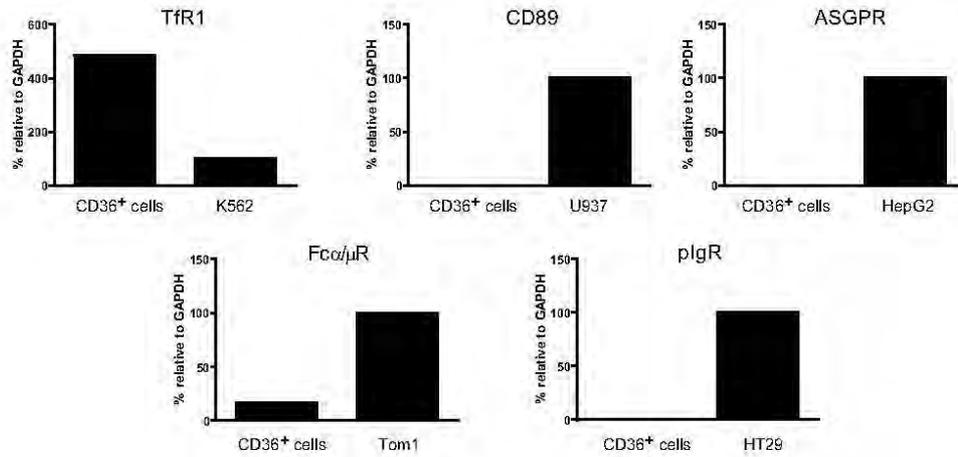
(A) Flow cytometric analysis of polymeric IgA (pIgA1) and monomeric IgA1 (mIgA1) binding to human BM cells. The cells were simultaneously stained for TfR1, GPA and CD11b to distinguish erythroid and mono-myeloid precursor cells.

(B) Immunoglobulin binding to BM erythroblasts (gated on GPA+TfR1+ and GPA+TfR1- subpopulations; left panels).

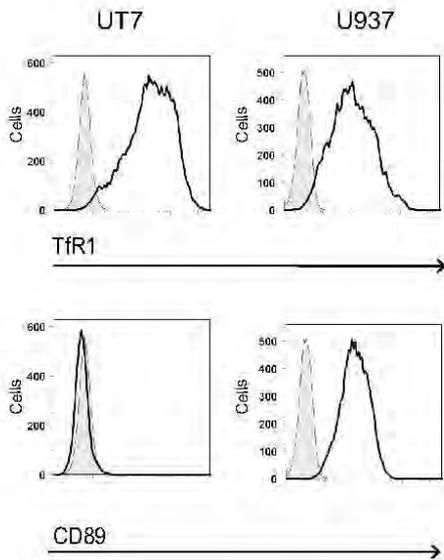
Histograms (right panels) demonstrating the binding of pIgA1 (black line), mIgA1 (dotted line) and IgG (shaded gray).

(C) Binding of pIgA1 (black line), mIgA1 (dotted line) and IgG (shaded gray) to CD36+ primary cells and the UT-7 cell line cultured in the presence of Epo.

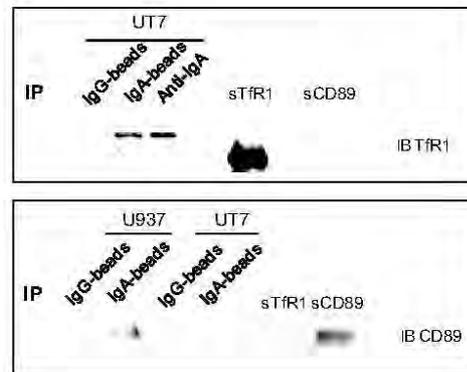
A



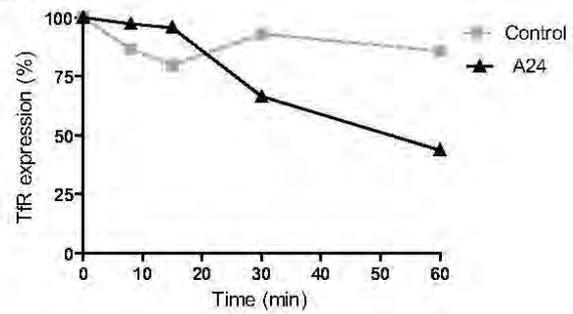
B



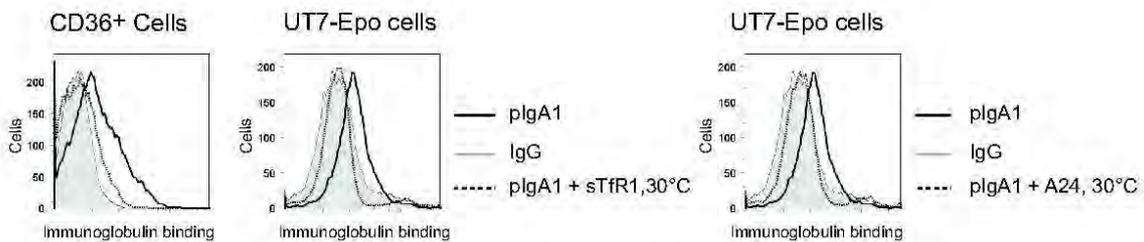
C



D



E



### Supplementary Figure 2: Human erythroid cells bind plgA1 through Tfr1

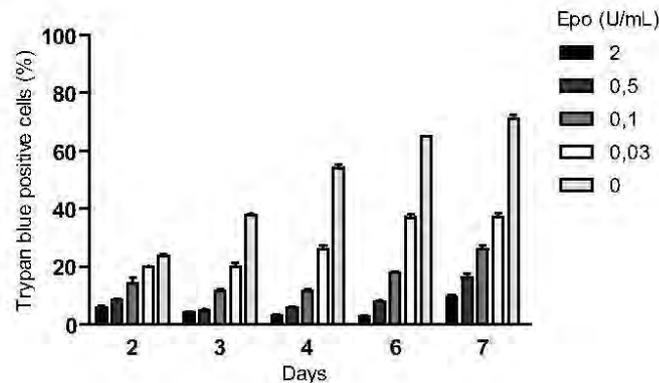
(A and B) Expression of IgA receptors on human erythroid cells. (A) Total RNA was extracted from CD36+ erythroid cells that had been cultured for 4 days, and the expression of the transcripts for the five known IgA receptors (TfR1, CD89, Fc $\alpha$ / $\mu$ R, plgR and ASGPR) was evaluated by quantitative RT-PCR. Positive controls from relevant cell lines were included.

(B) Immunofluorescence analysis of the expression of TfR1 or CD89 on the erythroid cell line UT-7 or the monocytic cell line U937 (black line) compared with the isotype control (shaded gray histogram). (C) Binding of plgA1 to TfR1 or CD89. Binding was demonstrated by co-immunoprecipitation with plgA1-conjugated Sepharose 4B beads or with plgA1 and F(Ab')<sub>2</sub> anti-IgA-conjugated Sepharose 4B. IgG-conjugated Sepharose 4B beads were used as a negative control.

The presence of TfR1 (upper panel; erythroid cell line UT-7 cultured with Epo) or CD89 (lower panel; monocytoid U937) was demonstrated by immunoblot. A24 induces TfR1 internalization in erythroid cells. (D) Flow cytometric analysis of the time course of the expression of cell surface TfR1 after treatment with 10  $\mu$ g/ml A24 or the isotype control (315.1 mAb).

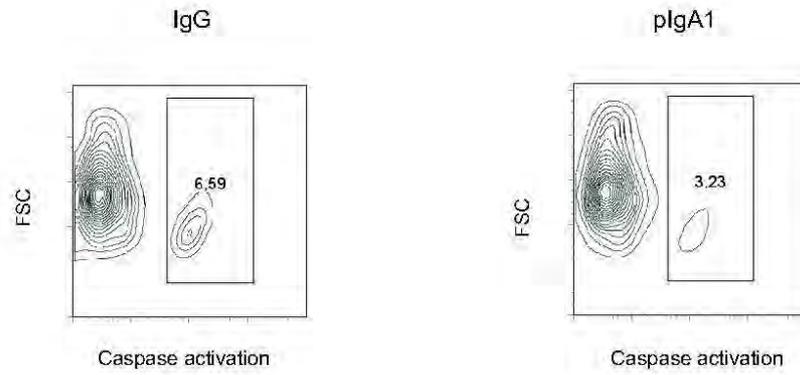
(E) Inhibition assays. plgA1 binding to CD36+ primary cells and UT-7 cells was inhibited using soluble (s)TfR1 (left). An anti-TfR1 antibody (A24 mAb), which induces the internalization of TfR1, was also used to inhibit plgA1 binding to UT-7 cells (right). plgA1 binding (continuous line), plgA1 binding after cell incubation with A24 or sTfR1 (dotted line) and IgG (shaded gray). The data are representative of three independent experiments.

Coulon et al.  
Supplemental Figure 3



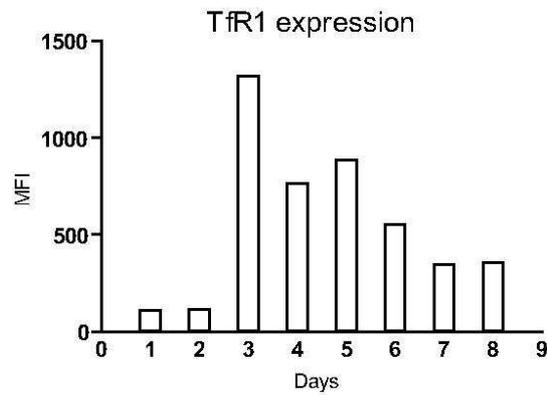
### Supplementary Figure 3: Sensitivity of primary CD36+ cells to Epo.

CD36+ erythroid cells were generated by culturing cord blood-derived CD34+ progenitors for 7 days, isolated and cultured in the presence of IL-3 (10 ng/ml), SCF (100 ng/ml) and increasing concentrations of Epo (0.03 to 2 U/ml). Cell growth and survival was evaluated every two days. The data are presented as the mean  $\pm$  SEM.



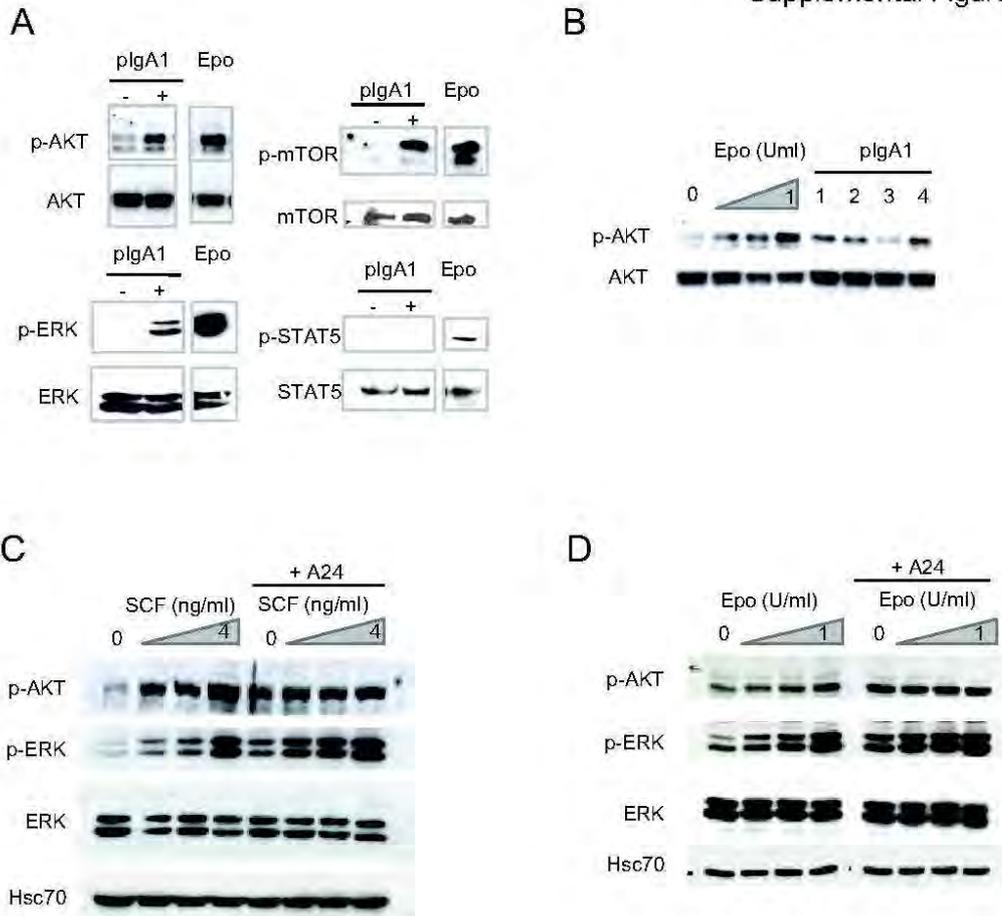
**Supplementary Figure 4: pIgA1 protects erythroblasts from caspase-induced apoptosis.**

Immunofluorescence assay for caspase activity in UT-7 cells deprived of Epo for 18 hours and cultured in the presence or absence of pIgA1 (0.2 mg/ml).



**Supplementary Figure 5: Analysis of TfR1 expression throughout erythroblast differentiation.**

Flow cytometric analysis of the time-course of TfR1 expression in CD36+ cultures.

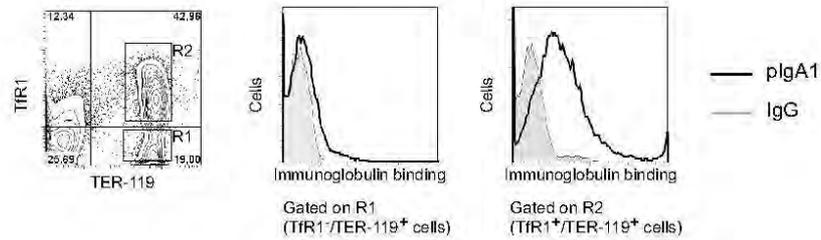


**Supplementary Figure 6: Induction of PI3K/AKT and ERK1/2 signaling pathways by plgA1 and anti-TfR mAb.**

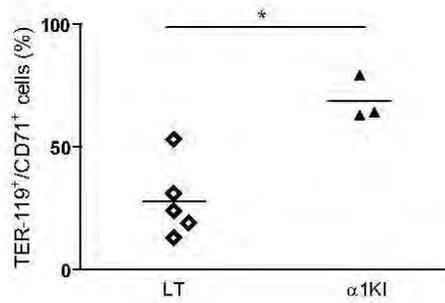
(A) plgA1 induces the phosphorylation of AKT, mTOR and MAPK/ERK1/2 but not STAT5. UT-7 cells ( $2 \times 10^6$  cells/condition) were starved of growth factors for 18 hours and incubated with Epo (1 U/ml) or plgA1 (0.2 mg/ml) for 3 min. The phosphorylation of AKT (Ser 473) and of its downstream effectors, mTor (Ser 2448), ERK1 (Thr 202 and Tyr 204 residues), ERK2 (Thr 185 and Tyr 187) and STAT5 (Tyr 694) were examined by immunoblotting whole cell lysates. Equal loading for each sample was controlled for by immunoblot.

(B) To confirm that cell activation is not restricted to a particular IgA1 from the myeloma, plgA1 purified from four different IgA-producing myelomas were tested for their ability to induce AKT phosphorylation. Increasing concentrations of Epo (0.03–2 U/ml) were used as a positive control for cell activation. An immunoblot for AKT was used to control for equal loading. The data are representative of three independent experiments. Induction of the PI3K/AKT and ERK1/2 signaling pathways following TfR1 triggering. (C-D) UT-7 cells were deprived of Epo and stimulated for 3 min with various concentrations of SCF (0.16–4 ng/ml) (C) or Epo (0.03–1 U/ml) (D) in the presence or absence of the anti-TfR antibody A24. The total protein expression, as well as the phosphorylation of AKT and ERK1/2, was evaluated by immunoblot. The data are representative of three independent experiments.

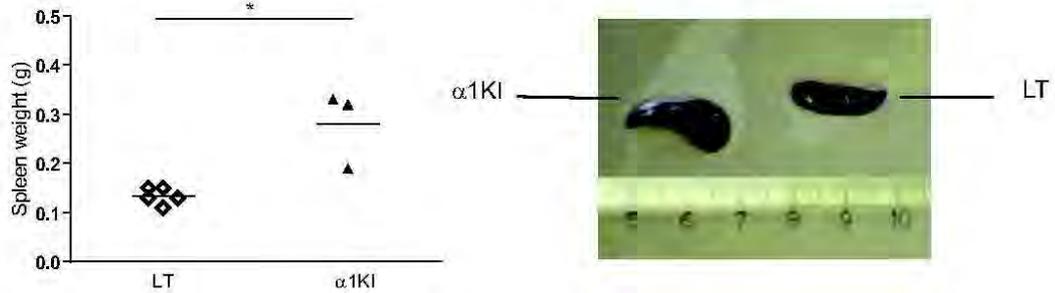
A



B



C

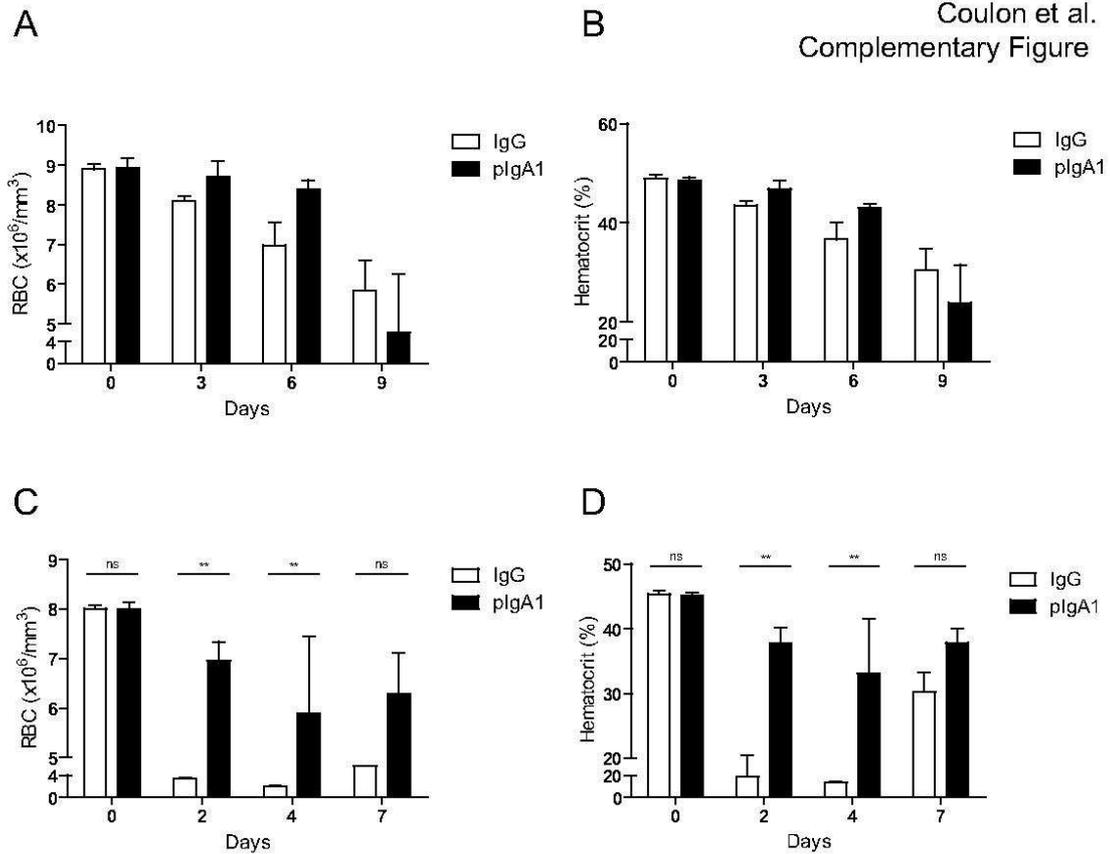


**Supplementary Figure 7: Effect of pIgA1 on murine erythropoiesis**

Human pIgA1 binds murine erythroid cells expressing Tfr1. (A) Human pIgA1 or IgG were added to murine erythroid cells, and the immunoglobulin binding in each population was detected by immunofluorescence using a biotinylated goat anti-human IgA (or anti-human IgG) antibody and APC-conjugated streptavidin. Human pIgA1 enhances spleen stress erythropoiesis in mice. (B-C) Mice were subjected to PHZ-induced hemolytic anemia (injections on day 0 and 1) and erythropoietic response to acute anemia was evaluated. (B) The percentage of TER-119<sup>+</sup>/GPA<sup>+</sup> cells in the spleen was evaluated by immunofluorescence. (C) The spleen weight was evaluated at day 9 and a representative photo of spleen from  $\alpha$ 1KI (left) and littermate controls (right) is shown.

The data are expressed as data from individual mice (B and C). The bars represent the means.

Black triangles ( $\alpha$ 1KI mice) and white diamonds (littermate controls), \*p < 0.05.

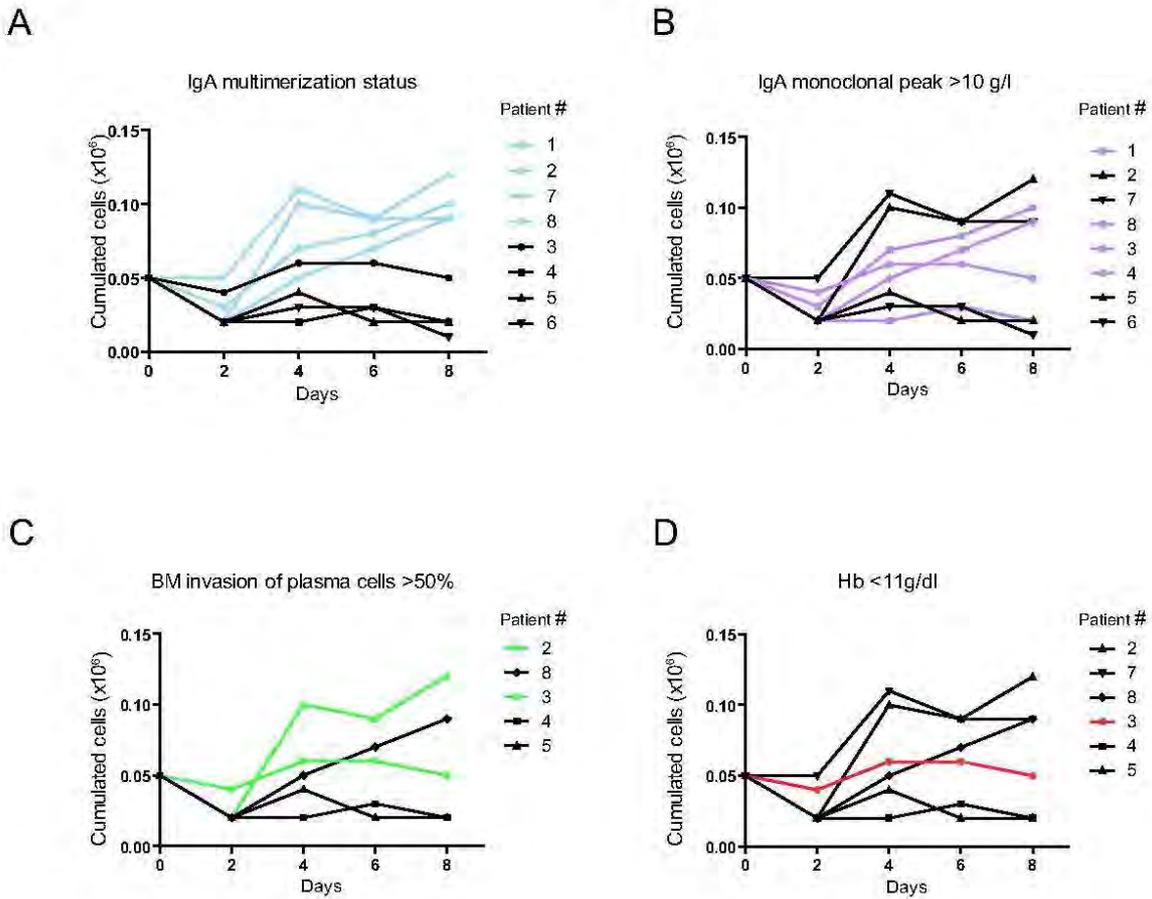


**Figure : Role of human plgA1 in others models of anemia**

(A-B) NOD/SCID mice were subjected to 5FU-induced aplasia (one injection at 150 mg/kg on day 0) and treated with human IgG or polymeric IgA (400 µg every two days intravenously) over 9 days as indicated. The erythropoietic response to anemia was evaluated in plgA1-treated mice (black bars) and IgG-treated mice (empty bars). The hematocrit level (A), and red blood cell concentration (B) (n=3 in each group).

(C-D) In a second model, autoimmune hemolytic anemia was induced by a single intraperitoneal injection of 200 µg purified anti-rbc 34-3C IgG2a derived from unmanipulated NZB mice on NOD/SCID mice treated with human IgG or polymeric IgA (400 µg every two days intravenously) over 7 days as indicated. The erythropoietic response to acute anemia was evaluated in plgA1-treated mice (black bars) and IgG-treated mice (empty bars). The hematocrit level (C), red blood cell concentration (D) were analyzed.

The data are expressed as the mean ± SEM. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 (n=4 in each group).



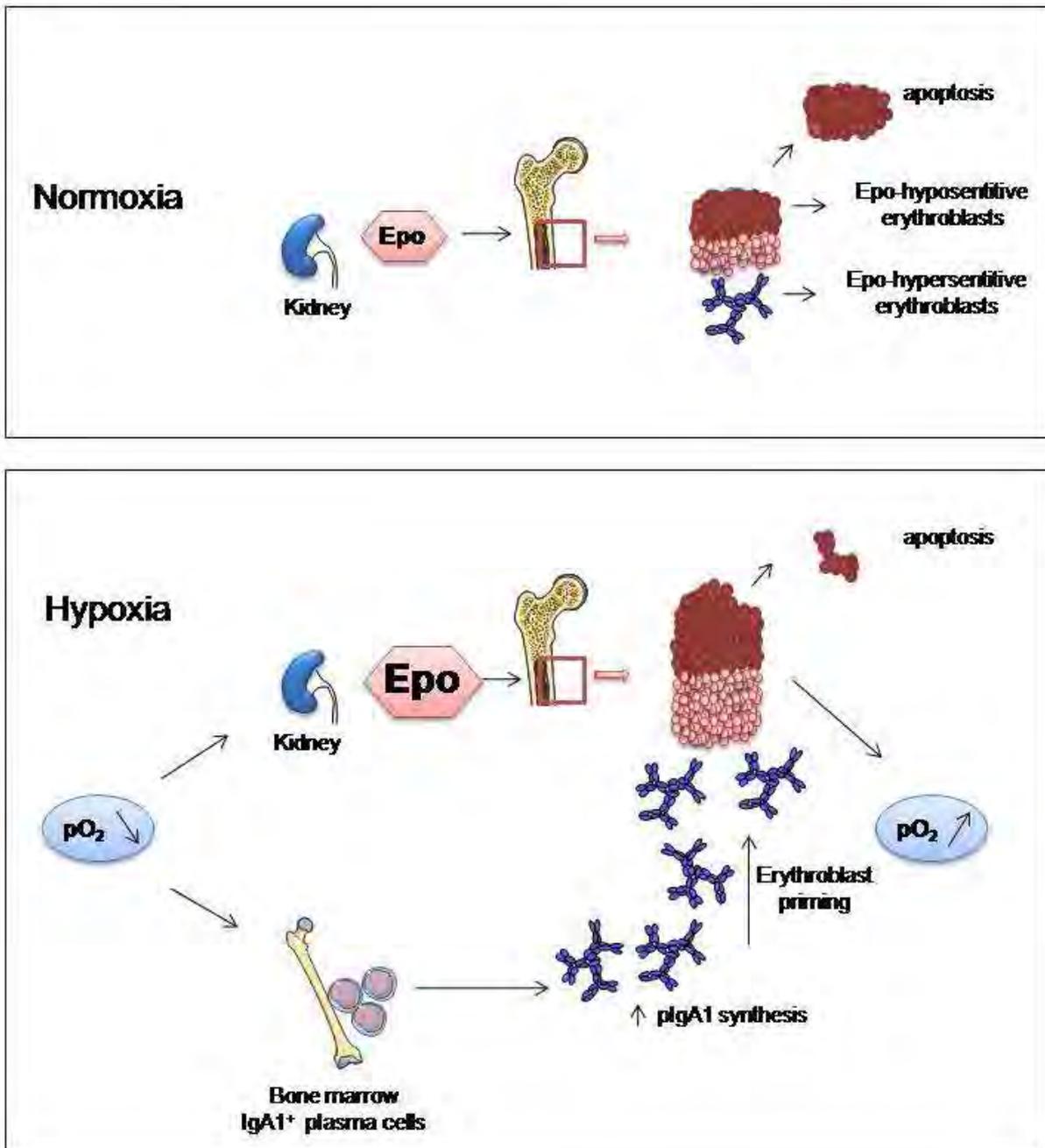
**Supplementary Figure 9: Serum pIgA1 induces proliferation of erythroblasts.**

CD36+ cells were cultured for 8 days in the presence of serum from IgA-producing myeloma patients. The cell number in the presence of serum from each patient was determined every two days and correlated with several biological parameters:

- (A) the multimerization status of IgA1 (pIgA1 in blue),
- (B) the concentration of monoclonal IgA peak (>10 g/l in pink),
- (C) plasma cell invasion of the BM of the corresponding patient (>50% in green) and
- (D) Hb serum concentration (<11 g/dl in orange).

The data are presented as the mean + SEM. Not all parameters could be collected from all patients.



**B**

**Supplementary Figure 10: Model summarizing the role of pIgA in erythropoiesis.**

(A) The Epo threshold is lowered by the binding of pIgA. Tfr1 triggering on erythroblasts allows for proliferation and survival by the activation of two major signaling pathways, PI3K/AKT and MAPK/ERK.

(B) Variation in the red blood cell number is dependent on the Epo concentration, which is physiologically controlled by the oxygen tension. Under normoxia conditions, the circulating Epo level is suboptimal (5-30 mU/ml), and Epo-hyposensitive erythroblasts undergo apoptosis. A reduced tissue oxygen tension (hypoxia) induces Epo production by the kidneys, allowing for the growth of Epo-hypersensitive erythroblasts. In addition, hypoxia induces pIgA production by plasma cells. pIgA binding to Tfr1 confers hypersensitivity of erythroblasts to Epo.

# Supplementary Table

**Supplementary Table 1: Sequences of the primers used for RT-PCR:**

Target	Forward primer	Reverse primer
TfR1	TGTGGCGTATAGTAAGGCTGC	GAAATTTAGTCTGGTCCATGT
CD89	GCAAACAAGGCAGGGCGCTAT	TCCCTCCTTGGCCAGTGAAAA
Fc $\alpha$ / $\mu$	CCGGGCCATGGGAACACTCAG	CCCAGACGGCACCAGTACTTC
pIgR	ATCAATAGCCGAGGCCTGTCC	TCTTGAAAGGGCAGTTGATGG
ASGPR	ACAATGAGGAGAGTGACCACC	CACACAGACAACCACAAGCAG

# Methods

## Patients

BM aspirates and sera were collected from patients admitted to the hematology department at Necker-Enfants-Malades Hospital. Umbilical cord blood cells from normal full-term deliveries were obtained from the obstetrics department. In each instance, informed consent was obtained from the donors.

## Antibodies and reagents

Anti-TfR1 (A24; IgG2b $\kappa$ )<sup>5</sup> and anti-IgA (Southern Biotech) mAbs were used. Human myeloma-derived IgA1 (Dou, Oli and Prud) were purified as previously described<sup>5</sup>. Fractions containing monomeric (m) and polymeric (p) IgA1 were prepared by high performance liquid chromatography (HPLC) (GE Healthcare; >99% pure) using ion-exchange chromatography through diethylaminoethyl cellulose (DEAE) and size-exclusion chromatography on Superdex 200 columns. Human serum IgG was from ICN (ICN Biomedicals, Irvine, CA).

## Mice

$\alpha$ 1KI mice were generated as described (Cogné et al manuscript under revision). Briefly, a human genome 6kb fragment containing the  $\alpha$ 1 gene was flanked with 5' and 3' arms (from murin S $\mu$  and C $\mu$  region, respectively) to allow homozygous recombination. A Neo cassette (flanked by *loxP* sites) was also added to allow selection of recombinants. E14 ES cells were transfected with the construct, recombinants isolated (after G-418 selection) and identified by Southern Blot.  $\alpha$ 1KI $Neo/\alpha$ 1KI $Neo$  mice were further mated with EIIa-cre transgenic mice and progeny checked for NEO excision.

NOD/SCID mice (6-8 weeks old) were from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). All animal experiments were approved by the INSERM Ethics Committee for Animal Experimentation. Acute anemia was induced by injection of phenylhydrazine (Sigma, St Louis, MO) at a concentration of 50 mg/kg twice with an interval of 24 hours. Blood was collected from the retro-orbital plexus, and hematological parameters were monitored with a MS9 analyzer (Melet schloesing, USA).

Reticulocyte counts were performed on blood smears stained with brilliant cresyl blue (Merck, Darmstadt, Germany).

### ***In vitro* generation of erythroid cells**

CD34<sup>+</sup> progenitors were isolated from cord blood using the Milteny CD34 Progenitor Cell Isolation Kit and cultured for 7 days with IL-6 (100 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml) and SCF (100 ng/ml). Erythroid cells were further differentiated from isolated CD36<sup>+</sup> cells cultured in the presence of IL-3 (10 ng/ml), SCF (100 ng/ml), Epo (2 U/ml) in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Gibco cell culture) supplemented with 15% BIT 9500 (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada), as previously described<sup>25</sup>. In some cases, CD36<sup>+</sup> cells were cultured with cytokines as described above in IMDM supplemented with insulin (7.5 µg/ml), bovine serum albumin (7.5 mg/ml) and 5% human serum from healthy subjects, IgA-deficient patients or IgA-producing myeloma patients.

UT-7 cells<sup>26</sup> were maintained in  $\alpha$ -minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Hyclone) and Epo (2 U/ml) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub>, humidified atmosphere. To starve cells from growth factors, the cells were washed and maintained in medium without cytokines for 16-18 h before the experiments and processed as described below. In some experiments cells were starved of growth factors and of transferrin for 18h in the presence of IMDM containing 0.4% BSA and 5µM Fe-NTA .

### **Immunofluorescence Analysis**

For binding assays, the cells ( $0.25 \times 10^6$ ) were pre-incubated with 1 mg/ml of human IgG for 30 min on ice in order to block FcγR. IgA binding was examined using an indirect immunofluorescence assay in which cells were incubated with 0.5 mg/ml of IgA for 1 h on ice, washed and incubated with a biotinylated anti-IgA mAb (Southern biotech) for 20 min at 4°C. After additional washes, allophycocyanin-labeled streptavidin (SA-APC; BD Pharmingen) was used as a developing reagent. For inhibition studies, cells were pre-incubated with the recombinant ectodomain of TfR1 (0.3 mg/ml at 4°C)<sup>12</sup> or with A24 (10 µg/ml at 37°C)<sup>5</sup> for 1 h before the addition of IgA1 to the cells. Fluorescence was analyzed by flow cytometry (FACScalibur; Becton Dickinson, NJ).

BM aspirates were depleted of erythrocytes following lysis in ammonium chloride. After 30 min of incubation with non-specific human IgG as described above, the cells were stained with a FITC-conjugated anti-TfR1 antibody and a PE-conjugated anti-glycophorin A or a PE-conjugated anti-CD11b

antibody (Beckman Coulter, CA, USA). For the BM and splenocyte suspensions from mice, the Fc blocking was performed with 24G2, and the cells were stained with a PE-conjugated anti-TER-119 antibody and a FITC-conjugated anti-TfR1 antibody (BD Biosciences-Pharmingen).

## **Apoptosis assays**

Cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with FITC-conjugated annexin V and propidium iodide (PI; Beckman Coulter), according to the manufacturer's recommendations. For the detection of caspase activity, the cells were cultured overnight in the presence of 0.2 mg/ml plgA1 or IgG. The cells were then cultured for 30 min in the presence of a fluorogenic caspase substrate (Cytosilux, Oncolmmunin, Gaithersburg, MD). Following incubation and washing, the samples were analyzed by flow cytometry. The cleavage of the substrate by activated caspases causes increased green fluorescence in dying cells.

## **Immunoprecipitations and immunoblotting analysis.**

Cells ( $1 \times 10^7$ /ml) were incubated for various lengths of time at 37°C with Epo (0.05 to 0.1 U/ml), SCF (0.16 to 4 ng/ml), plgA1 (0.2 mg/ml), A24 (10 µg/ml) or Fe-Tf (150 µg/ml). The reaction was stopped by the addition of an excess of cold PBS. The cells were lysed in 1 ml of lysis buffer (50 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 0.5% Triton X-100, 50 mM HEPES, 10 µg/ml leupeptin and 10 µg/ml aprotinin) for 10 min at 4°C and centrifuged to obtain the soluble fraction. Proteins were quantified by the bicinchoninic acid method according to the manufacturer's instructions (Pierce, Rockford, IL). The concentrations were equalized, and the extracts were boiled for 5 min in Laemmli sample buffer (62 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS and 5% β-mercaptoethanol). The protein (30 µg per lane) was loaded on a 10% SDS-PAGE gel and transferred onto a PVDF membrane (GE Healthcare, USA). The specific proteins were detected by immunoblotting using antibodies against p-AKT (Ser473) and AKT, p-P42/44 (Thr 202 Tyr 204 residues of ERK1 and Thr 185 Tyr 187 of ERK2) and P42/44, p-mTor (Ser2448), p-Jak2 (Tyr1007/1008), p-STAT5a (Tyr 694; Cell Signaling, MA, USA) or Hsc 70 (Stressgen, Ann Harbor, USA) and a HRP-conjugated secondary Ab (Santa Cruz biotechnology, CA, USA). Antibody binding was visualized by chemoluminescence with an ECL kit (Pierce, France).

## **Methylcellulose assay**

Single cell suspensions of adult mice BM or spleen were mixed with methocult M3434 medium (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada), plated into 35 mm dishes and cultured at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. The BFU-E colonies were scored at day 10. Human progenitors from cord blood cells were plated in methocult H4230 in the presence of IL-6 and IL-3 (20 ng/ml), GM-CSF (10 ng/ml) and various concentrations of SCF (0.1–100 ng/ml) and/or Epo (0.5–2 U/ml). The colonies were counted at day 16.

## **Serum fractionation**

A total of 0.5 ml of serum was diluted in phosphate buffer (0.05 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.02 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH 7.5]), filtered, and separated by gel filtration chromatography in a HiPrep Sephacryl S-300 HR column (GE Healthcare) connected to an HPLC AKTA-basic automated liquid chromatography system (GE Healthcare). Fractions of 1.0 ml were collected for analysis. The molecular size of each fraction was determined by calibration of the column with a calibration kit (GE Healthcare). The IgA concentration in the fractions was determined using a sandwich ELISA.

## **Measurement of IgA and Epo levels**

To determine the IgA concentration in the column fractions, plates were coated for 2 hours at room temperature with an anti-IgA polyclonal Ab (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) diluted to a final concentration of 10 µg/ml in borate-buffered saline (BBS). The wells were washed twice in PBS containing 0.05% Tween 20 and blocked for 30 min at room temperature in PBS containing 1% BSA and 0.1% sodium azide. Column fractions (diluted at 1:100) were added to the wells and incubated overnight at 4°C. An alkaline phosphatase–conjugated IgA-specific antibody (BD Pharmingen) was used as the developing Ab. The optical density at 405 nm was measured after addition of the AP substrate (Sigma), following the manufacturer's instructions. The Epo concentration was measured by ELISA (Quantikine IVD, R&D system) following the manufacturer's recommendations.

## **Quantitative real-time RT-PCR**

RNA was extracted from erythroid progenitors using Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel, Hoerd, France) and treated with DNase. One microgram of total RNA was used for reverse transcription

using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) and random hexamers at 42°C for 15 minutes. The cDNA was then denatured at 99°C for 5 minutes and incubated at 5°C for 5 minutes. For qPCR, the cDNA samples were amplified in a ChromoIV PCR System (MJ Research) as follows: 95°C for 105 seconds; 35 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 30 seconds; and 72°C for 7 minutes. The PCR products were quantified using SybrGreen (SYBRGREEN Jumpstart readymix, Sigma Aldrich). The forward and reverse primers sequences used are described in supplementary Table 1.

## **Statistical analyses**

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism (version 5.0; GraphPad Software). The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of *n* determinations unless noted otherwise. Student's *t*-test was used to compare two groups, whereas multigroup comparisons were made using two-way ANOVA test followed by post-hoc analysis (Bonferroni test). Differences were considered significant at a P value less than 0.05 (\*), less than 0.01 (\*\*), or less than 0.001 (\*\*\*)

# References

1. Astor, B.C., Muntner, P., Levin, A., Eustace, J.A. & Coresh, J. Association of kidney function with anemia: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994). *Arch Intern Med* **162**, 1401-1408 (2002).
2. Bohlius, J., *et al.* Erythropoietin or darbepoetin for patients with cancer. *Cochrane Database Syst Rev* **3**, CD003407 (2006).
3. Goldwasser, E. Erythropoietin and its mode of action. *Blood Cells* **10**, 147-162 (1984).
4. Strippoli, G.F., Navaneethan, S.D. & Craig, J.C. Haemoglobin and haematocrit targets for the anaemia of chronic kidney disease. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003967 (2006).
5. Moura, I.C., *et al.* Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. *J Exp Med* **194**, 417-425 (2001).
6. Russell, E.S. Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet* **20**, 357-459 (1979).
7. Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R. & Lodish, H.F. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* **83**, 59-67 (1995).
8. Zermati, Y., *et al.* Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* **193**, 247-254 (2001).
9. Ribeil, J.A., *et al.* Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* **445**, 102-105 (2007).
10. Levy, J.E., Jin, O., Fujiwara, Y., Kuo, F. & Andrews, N.C. Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat Genet* **21**, 396-399 (1999).
11. Schmidt, P.J., Toran, P.T., Giannetti, A.M., Bjorkman, P.J. & Andrews, N.C. The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab* **7**, 205-214 (2008).
12. Lebron, J.A., *et al.* Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* **93**, 111-123 (1998).
13. Radoshitzky, S.R., *et al.* Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature* **446**, 92-96 (2007).
14. Moura, I.C., *et al.* Glycosylation and size of IgA1 are essential for interaction with mesangial transferrin receptor in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **15**, 622-634 (2004).
15. Matysiak-Budnik, T., *et al.* Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med* **205**, 143-154 (2008).
16. Kutteh, W.H., Prince, S.J. & Mestecky, J. Tissue origins of human polymeric and monomeric IgA. *J Immunol* **128**, 990-995 (1982).
17. Lesley, J., Hyman, R., Schulte, R. & Trotter, J. Expression of transferrin receptor on murine hematopoietic progenitors. *Cell Immunol* **83**, 14-25 (1984).
18. Monteiro, R.C. & Van De Winkel, J.G. IgA Fc receptors. *Annu Rev Immunol* **21**, 177-204 (2003).

19. Moura, I.C., *et al.* A neutralizing monoclonal antibody (mAb A24) directed against the transferrin receptor induces apoptosis of tumor T lymphocytes from ATL patients. *Blood* **103**, 1838-1845 (2004).
20. Lepelletier, Y., *et al.* Prevention of mantle lymphoma tumor establishment by routing transferrin receptor toward lysosomal compartments. *Cancer Res* **67**, 1145-1154 (2007).
21. Lenox, L.E., Perry, J.M. & Paulson, R.F. BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia. *Blood* **105**, 2741-2748 (2005).
22. Jacob, C.M., Pastorino, A.C., Fahl, K., Carneiro-Sampaio, M. & Monteiro, R.C. Autoimmunity in IgA deficiency: revisiting the role of IgA as a silent housekeeper. *J Clin Immunol* **28 Suppl 1**, S56-61 (2008).
23. Koury, M.J. Erythropoietin: the story of hypoxia and a finely regulated hematopoietic hormone. *Exp Hematol* **33**, 1263-1270 (2005).
24. Koury, M.J. & Bondurant, M.C. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* **248**, 378-381 (1990).
25. Zermati, Y., *et al.* Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. *Exp Hematol* **28**, 885-894 (2000).
26. Komatsu, N., *et al.* Establishment and characterization of a human leukemic cell line with megakaryocytic features: dependency on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin 3, or erythropoietin for growth and survival. *Cancer Res* **51**, 341-348 (1991).

# Discussion et perspectives

Dans ce travail, j'ai étudié les conséquences physiologiques de l'interaction plgA1/RTf1 dans l'érythropoïèse. J'ai montré que l'engagement du RTf1 joue un rôle important dans la régulation positive de la production des érythroblastes, indépendamment de son rôle dans le métabolisme du fer. L'interaction RTf1/plgA1 induit l'activation de deux voies de signalisation majeures (PI3K/Akt et MAPK) impliquées dans la prolifération des érythroblastes, et potentialise l'activation de ces voies par le SCF et l'Epo. Ce phénomène de sensibilisation des érythroblastes par les plgA1, permet de réguler le pool de précurseurs hypersensibles à l'Epo. Par des expériences *in vivo* chez la souris, en utilisant des modèles de transfert passif et un modèle d'expression *knock-in* des IgA1 humaines, j'ai montré que les plgA1 permettent une meilleure régénération de l'érythropoïèse en cas d'anémie. La régulation de la synthèse des plgA1 semble être dépendante du niveau d'oxygénation tissulaire car, en cas d'hypoxie chronique, les taux sériques de plgA1 sont augmentés. La détermination des effecteurs impliqués dans la signalisation du RTf1 pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes fins de régulation de l'érythropoïèse. D'autre part, le RTf et ses effecteurs pourraient constituer une cible thérapeutique attractive pour le développement de nouveaux agents modulateurs de l'activité de l'Epo. Plusieurs aspects concernant l'activation du RTf1 par les plgA1 et ses conséquences physiologiques et pathologiques méritent d'être discutés.

## 1 Les plgA1 régulent positivement l'érythropoïèse

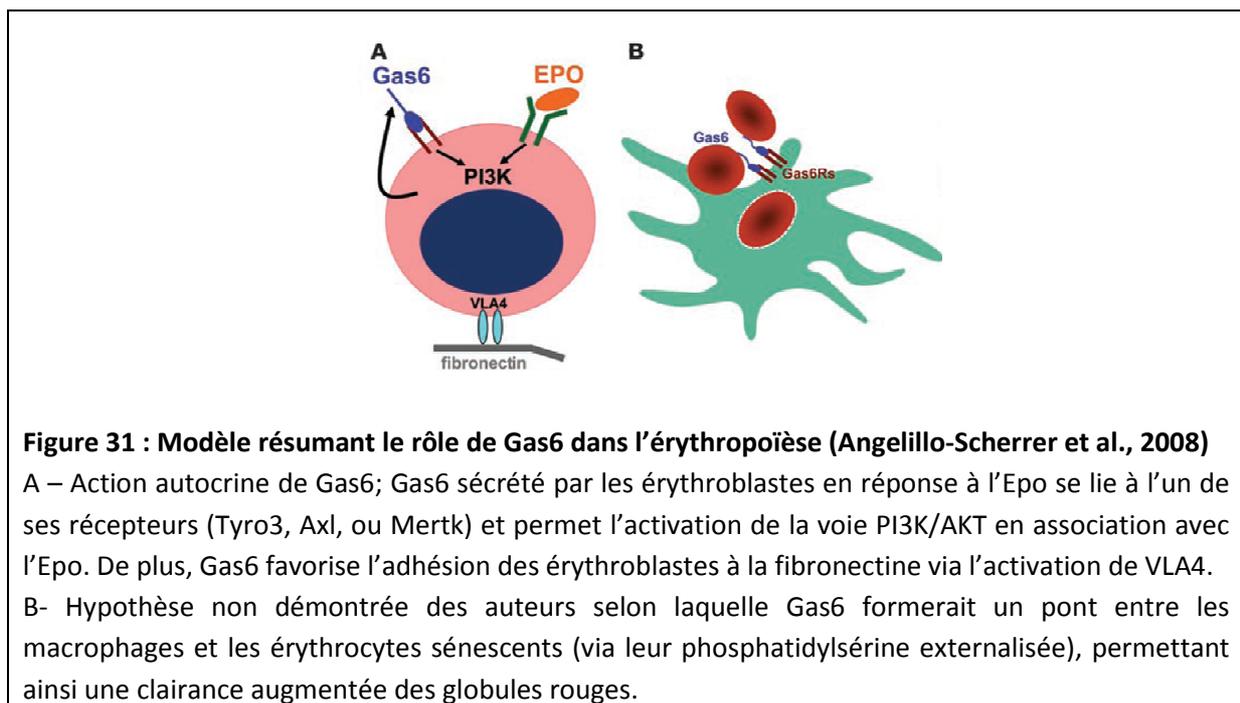
### 1.1 plgA1 : un nouvel acteur modulant la sensibilité des érythroblastes à l'Epo

Afin d'étudier l'impact de la liaison des plgA1 au RTf1 des érythroblastes, j'ai tout d'abord vérifié la spécificité de cette interaction au niveau de la lignée érythroïde. Ainsi, sur des cellules médullaires, les plgA1 se lient aux cellules  $GPA^+/RTf1^+$  et non aux cellules  $GPA^+/RTf1^-$ . La liaison des mlgA1 est faible et restreinte aux cellules myéloïdes qui expriment le  $Fc\alpha RI$ . La spécificité de cette interaction a été vérifiée sur des érythroblastes primaires en culture et sur les cellules de la lignée UT-7 cultivée en présence d'Epo. L'ajout de sRTf1 et de l'anticorps monoclonal anti-RTf1 A24 (qui induit l'endocytose du RTf1) inhibe la fixation des plgA1 sur ces cellules. La liaison des plgA1 au RTf2

n'a pas été évaluée sur les érythroblastes, car ce récepteur n'est pas décrit comme étant présent à leur surface (Calzolari et al., 2004). Cependant, comme nous l'avons vu dans l'introduction, les transcrits du RTf2 sont retrouvés en quantité importante au cours de la différenciation érythroïde (Sposi et al., 2000) et il serait intéressant de réévaluer l'expression de ce récepteur sur les érythroblastes avec de nouveaux anticorps. D'autre part, il a été suggéré dans d'autres modèles, bien que non formellement démontré, que les plgA1 pourraient également se lier au RTf2 (Moura et al., 2004a). En effet, sur les cellules mésangiales, l'ajout de RTf2 soluble (sRTf2) inhibe la fixation des plgA1 (Moura et al., 2004a). Ainsi, l'interaction plgA1/RTf2 reste encore à être évaluée sur les érythroblastes, dans l'hypothèse de l'expression du récepteur. Toutefois, plusieurs constatations laissent penser que l'action des plgA1 dans l'érythropoïèse concerne essentiellement le RTf1. En effet, la diminution du nombre de RTf1 sur les cellules inhibe la liaison des plgA1 aux érythroblastes et la stimulation du RTf par A24, qui est spécifique RTf1 et non du RTf2, permet l'activation des mêmes voies de signalisations que les plgA1 (PI3K/AKT et ERK1/2). Le site de liaison des IgA1 sur le RTf reste inconnu. Le RTf1 et RTf2 présentent 66 % d'homologie et 45 % d'identité (Kawabata et al., 1999; West et al., 2000) laissant présager d'une fixation des plgA1 sur un domaine commun des deux récepteurs. La génération d'IgA1 mutées pourrait aider à identifier les domaines des IgA1 impliqués dans l'association avec le RTf de type 1 et de type 2.

Afin d'évaluer l'effet de la liaison des plgA1 sur les érythroblastes, nous avons utilisé un système de culture en milieu semi-solide pour l'étude des progéniteurs érythroïdes et un système de culture liquide à partir de cellules CD34<sup>+</sup> issues de sang cordon pour les précurseurs (Zermati et al., 2000; Zermati et al., 2001). Nous avons utilisé une concentration sous-optimale d'Epo (100 mUI/ml), qui provoque l'apoptose de 50% des érythroblastes en milieu liquide, afin de refléter les conditions physiologiques des érythroblastes dans la moelle osseuse. En effet, en condition physiologique, les taux d'érythropoïétine sont sous-optimaux et ne permettent pas la survie de tout le pool érythroïde médullaire. Nos expériences montrent que l'addition de plgA1 permet la croissance des érythroblastes en condition sous-optimale d'Epo, mais que les plgA1 n'ont pas d'action en conditions saturantes de cytokines. Ainsi, la liaison des plgA1 au RTf1 des érythroblastes les rend hypersensibles à l'Epo et ce résultat peut expliquer la différence de sensibilité des érythroblastes à l'Epo existant dans la moelle osseuse. En effet, dès 1990, l'équipe de Koury et de Bondurant émet l'hypothèse qu'il existe, au niveau médullaire, des érythroblastes hypersensibles à l'Epo qui vont survivre, et d'autres moins sensibles à l'Epo qui vont rentrer en apoptose (Koury and Bondurant, 1990). En 1993, Kelley *et al*, ont décrit qu'il existait une grande variabilité de sensibilité des érythroblastes à l'Epo et cela indépendamment de leur stade de différenciation, du nombre de R-Epo à leur surface et de la fonctionnalité de celui-ci (Kelley et al., 1993). D'autres études ont montré que la sensibilité des

érythroblastes à l'Epo était indépendante du nombre de récepteurs et de leur affinité pour l'Epo (Landschulz et al., 1992; Miura et al., 1991; Nakamura et al., 1992). Jusqu'à présent, les facteurs modulant cette différence de sensibilité étaient peu décrits. Récemment, l'équipe d'Angelillo-Scherrer a montré que la protéine vitamine-K dépendante Gas6 est impliquée dans la régulation positive de l'érythropoïèse (Angelillo-Scherrer et al., 2008). En effet, chez la souris, Gas6 est sécrétée par les érythroblastes, en présence d'Epo. Selon un mode autocrine, Gas6 sensibilise les précurseurs érythroïdes à l'Epo, notamment par l'activation de la voie PI3K/AKT. Les souris invalidées pour le gène de *Gas6* ont une érythropoïèse de stress altérée, mais restaurée par l'administration de protéine Gas6 recombinante (rGas6). D'autre part, les érythrocytes de ces souris ont une demi-vie augmentée du fait d'une moindre phagocytose par les macrophages. Dans un modèle d'anémie chronique par faible production d'Epo (Maxwell et al., 1993), l'administration de rGas6 a montré une synergie importante avec l'Epo au niveau de la restauration de l'hématocrite, laissant suggérer une application thérapeutique potentielle chez les patients anémiques peu répondeurs à l'Epo.



En résumé, Gas6 semble être un régulateur autocrine positif de l'érythropoïèse, mais d'autres études sont nécessaires afin d'évaluer son rôle paracrine, notamment au niveau des macrophages. Selon notre modèle, la régulation des érythroblastes par les plgA1 serait paracrine. Les plasmocytes médullaires permettraient la sécrétion de plgA1 qui, en se liant au RTf1 des érythroblastes, les sensibiliseraient à l'Epo. Nous n'avons pas retrouvé de présence accrue de plasmocytes à IgA1 près des îlots érythroblastiques, par immunohistochimie sur des biopsies ostéo-médullaires (résultats non

montrés). Néanmoins, il semble probable que les pIgA1 diffusent au sein de la moelle. Nos expériences en méthylcellulose, montrent que les pIgA1 permettent aussi de pallier à la baisse du nombre de colonies dérivées de BFU-E, induite par des concentrations sous-optimales de SCF. La concentration physiologique de SCF dans le sérum humain est en moyenne de 3,3 ng/ml (Langley et al., 1993) et ne semble pas varier selon les situations physiopathologiques (hypoxie ou polyglobulie). Néanmoins, lors d'expériences préliminaires, nous avons comparé les taux sanguins de SCF entre des volontaires sains et des patients présentant un déficit sélectif en IgA (DIgA) et nous avons trouvé des concentrations de SCF plus basses chez les DIgA par rapport aux volontaires sains ( $0,6 \pm 0,2$  ng/ml pour les DIgA vs  $2,1 \pm 0,9$  ng/ml pour les volontaires sains,  $n= 8$  dans chaque groupe, résultats non montrés). Il serait intéressant de savoir si les pIgA1, outre leur action sur l'amplification du signal médié par l'activation de C-Kit, ont une action sur les cellules stromales médullaires productrices de SCF. Dans ce cas, nous pourrions penser que la modulation du taux circulant de SCF par les pIgA1 pourrait avoir une implication dans la physiopathologie des hémopathies malignes, où le récepteur C-Kit est surexprimé.

## 1.2 Les pIgA1 amplifient l'érythropoïèse de stress lors d'une anémie

L'impact de la stimulation du RTf1 par les pIgA1 sur l'érythropoïèse a ensuite été évalué *in vivo* dans deux modèles murins : le transfert passif de pIgA1 et les souris  $\alpha$ -KI. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les IgA murines diffèrent en structure et en degré de polymérisation des IgA humaines. Chez la souris, il n'existe qu'une seule sous-classe d'IgA retrouvée sous forme polymérique (Monteiro and Van De Winkel, 2003). D'autre part, les IgA murines n'ont pas de sites de O-glycosylation dans leur région charnière, qui sont importants pour l'interaction avec le RTf1 (Moura et al., 2004b). C'est pourquoi, nous avons évalué l'action des pIgA1 humaines, après avoir préalablement vérifié que celles-ci se liaient bien au RTf1 murin. L'érythropoïèse murine est un système très finement régulé, principalement étudié en condition de stress. L'anémie hémolytique induite par la phénylhydrazine (PHZ) est un modèle largement utilisé par de nombreuses équipes (Angelillo-Scherrer et al., 2008; Golab et al., 2002; Lenox et al., 2005). La PHZ est un principe actif développé à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle comme antipyrétique et dont le développement a rapidement été arrêté du fait d'une forte toxicité au niveau des érythrocytes. La PHZ induit la formation de ROS (*reactive oxygen species*), la peroxydation des lipides et la dégradation oxydative de la spectrine du cytosquelette (pour revue voir (Berger, 2007)). L'action de la PHZ est sélective sur la spectrine des globules rouges et provoque une anémie hémolytique extravasculaire régénérative. De plus, nous

avons testé l'action des plgA1 dans d'autres modèles d'anémies régénératives, comme l'anémie provoquée par des saignements et une anémie hémolytique immune. Dans le dernier cas, nous avons utilisé une IgG2a anti-GR (clone 34-3C) dérivée de souris NZB, qui sont des souris susceptibles de développer des lupus et des anémies hémolytiques auto-immunes (Ozaki et al., 1984). L'anticorps utilisé induit une importante érythrophagocytose du fait de la liaison de sa partie Fc aux FcγRI des macrophages (Fossati-Jimack et al., 1999). Dans tous ces cas, l'injection de plgA1 a provoqué une augmentation du nombre de progéniteurs (BFU-E) et de précurseurs TER-119<sup>+</sup>/RTf1<sup>+</sup> spléniques par rapport aux souris injectées avec des IgG. L'érythropoïèse a été évaluée au niveau splénique, car c'est là que se déroule l'érythropoïèse de stress chez la souris (McCulloch et al., 1964). Cependant, nous avons difficilement retrouvé la présence de BFU-E de stress (BFU-Es) au bout de 5 jours de culture en milieu semi-solide (Lenox et al., 2005). C'est pourquoi, nous avons compté les BFU-E en milieu semi-solide à J10. Ceci peut s'expliquer par le fait que nous avons sacrifié les souris relativement tard (de J7 à J9), après l'induction de l'anémie. Par ailleurs, les paramètres hématologiques (nombre de globules rouges et hématocrite) ont été normalisés plus rapidement dans le groupe des souris injectées avec des plgA1. L'ensemble de ces résultats démontre que la stimulation du RTf1 avec les plgA1 permet l'induction d'une érythropoïèse de stress accrue, afin de normaliser les paramètres sanguins lors d'anémies régénératives de différentes étiologies. Une expérience complémentaire, avec un modèle d'anémie d'origine centrale induite au 5-FU, montre que le groupe plgA1 parvient à maintenir un hématocrite et un nombre de globules rouges assez élevé pendant 6 jours, par rapport au groupe IgG, avant de chuter à J9. Le 5-FU est un antimétabolite, qui inhibe la thymidylate synthase et ainsi la synthèse de l'ADN (Rich, 1991). Une hypothèse serait que les plgA1 ont un rôle protecteur sur les précurseurs érythroblastiques exprimant fortement le RTf1, leur permettant ainsi d'effectuer une différenciation érythroïde terminale. Cependant, l'atteinte des progéniteurs induit une anémie totale au bout d'un certain temps, ainsi qu'une atrophie et une acellularité de la rate.

Il serait intéressant d'évaluer l'impact des plgA1 dans des modèles d'insuffisance rénale chronique. Il existe peu de modèles murins disponibles à cet effet. Le plus décrit est un modèle transgénique (134.3 LC, Epo-TAg<sup>H</sup>), où une séquence d'ADN issue du SV40 (Simian Virus 40) a été insérée en amont du gène de l'Epo (en 5'), provoquant une invalidation partielle de l'expression du gène (Maxwell et al., 1993). Ainsi, ces souris, qui possèdent de faibles taux d'Epo, développent une anémie chronique (Ht à 30% versus 50% pour le phénotype sauvage) et sont de bons modèles afin d'évaluer l'efficacité d'agents stimulateurs de l'érythropoïèse (ESA) (Rinsch et al., 2002). Un modèle plus physiologique pourrait être réalisé par néphrectomie (Vaziri et al., 1996). Ces expériences sont actuellement en cours dans notre laboratoire.

D'autre part, nous avons utilisé un deuxième modèle murin exprimant la chaîne lourde des IgA1 humaines ( $\alpha 1KI$ ). Dans ce modèle, les souris expriment les régions constantes de la chaîne lourde (CH1-CH3) des IgA1 humaines (Duchez et al.). Ainsi, les IgA1 hybrides sont composées de la chaîne lourde humaine, de la chaîne légère murine, et sont capables de faire le réarrangement VDJ. De plus elles peuvent se polymériser à l'aide de la chaîne J murine. Au niveau sérique, ces IgA1 sont retrouvées essentiellement sous forme monomérique (80-90%), mimant le taux de polymérisation des IgA sériques chez l'homme (Monteiro and Van De Winkel, 2003). Au niveau basal, il n'y a pas de différence d'érythropoïèse entre les souris  $\alpha 1KI$  et les souris sauvages. Il n'existe pas non plus de différence de taux d'Epo circulants (résultats non montrés). Cependant, lors de l'induction d'une anémie hémolytique par la PHZ, les souris  $\alpha 1KI$  ont présenté un nombre deux à trois fois plus élevé de précurseurs érythroïdes spléniques ( $TER-119^+/TFR1^+$ ) par rapport aux souris contrôles. Cette érythropoïèse extra-médullaire importante est associée à une splénomégalie. Ainsi, dans ce modèle, la chaîne lourde des IgA1 humaines participe au contrôle de l'érythropoïèse de stress splénique.

### **1.3 Ciblage du RTf1 : une nouvelle cible thérapeutique**

Dans ce travail, nous avons montré que la présence d'IgA1 permet une restauration plus rapide de l'érythropoïèse en cas d'anémie dans deux modèles murins distincts. Ainsi, le ciblage du RTf1 représente une alternative thérapeutique attractive dans le traitement de l'anémie, notamment chez les patients peu répondeurs à l'Epo. La prise en charge de l'anémie est très largement étudiée depuis les 20 dernières années, date de la commercialisation des érythropoïétines recombinantes (rHuEpo), car elle présente un enjeu majeur économique et de santé publique dans les pays en voie de développement. En effet, l'anémie est un facteur délétère de plusieurs grandes pathologies, dont l'insuffisance rénale (Courtney and Maxwell, 2008) et le cancer (Caro et al., 2001). Avec la tombée dans le domaine public de l'Epo recombinante, la recherche de nouveaux composés a été très active, notamment au niveau des agonistes du récepteurs de l'Epo. Les agents simulateurs de l'érythropoïèse (ESA) regroupent de nombreux produits, comme l'érythropoïétine recombinante (rHuEpo), de la rHuEpo modifiée chimiquement afin de prolonger sa demi-vie plasmatique (darbepoietin, CERA), ou des activateurs du récepteur de l'Epo (en essais clinique). Des agents modulant l'hypoxie, comme des inhibiteurs de prolylhydroxylases, sont aussi en cours de développement (pour revue voir (Bunn, 2007; Casadevall et al., 2008)). D'autre part, il a été montré dans plusieurs essais cliniques que le traitement par rHuEpo était optimisé par une adjonction de fer. Le fer par voie intraveineuse (IV) (mais non par voie orale) permet une meilleure augmentation du

taux d'hémoglobine en réponse à la rHuEpo et permet de baisser les doses administrées de rHuEpo chez les patients insuffisants rénaux chroniques (Fishbane et al., 1995; Macdougall et al., 1996) et atteints de cancer (Auerbach et al., 2004). Cependant, l'administration de fer IV reste problématique, notamment à cause du risque allergique important aux dextrans. D'autres formulations de fer IV ont été mises au point, afin de tenter de diminuer les effets indésirables de ce type de médication (pex Ferinject; Vifor Pharma, Zurich, Switzerland). Enfin, des préparations de Fe-Tf et d'Apo-Tf ont été brevetées en tant qu'agent stimulant de l'érythropoïèse en association, ou non, avec de l'érythropoïétine dans l'anémie consécutive aux insuffisances rénales chroniques (patent US 2003/0229012 A1). Le fait que l'Apo-Tf ait aussi une action positive sur l'érythropoïèse sous-tend l'hypothèse que l'action stimulante de ce type de préparation n'est pas uniquement due à l'apport de fer, mais que la stimulation du RTf1 par des agonistes peut avoir une action. Dans notre cas, l'injection d'IgA1 semble difficilement envisageable chez l'homme du fait de risque allergique important, notamment chez les patients déficitaires en IgA dont la prévalence est importante dans la population générale. D'autre part, l'anticorps A24 n'est pas un bon candidat pour ce type de thérapie car, bien que stimulant le RTf1 à des temps précoces, il induit ensuite l'internalisation de celui-ci et l'inhibition de son recyclage à la surface cellulaire. La structure extracellulaire du RTf1 est cristallisée (Lawrence et al., 1999) et nous envisageons de déterminer les sites de fixations putatifs de ligands activateurs. A partir de ces sites, nous pourrions envisager la synthèse de peptides agonistes du RTf1 et tester leur activité dans ce modèle.

## **2 L'activation du RTf1 induit et amplifie des voies de prolifération cellulaire**

Nous montrons, pour la première fois, que l'activation du RTf1 induit deux voies de signalisation importantes dans l'érythropoïèse : la voie PI3K/AKT et la voie ERK1/2. La phosphorylation des effecteurs de ces voies peut être provoquée par différents ligands du RTf1 : les pIgA1, un anticorps anti-TfR1 et le ligand classique du RTf1, la Fe-Tf. Ainsi, le RTf1 ne se limite pas dans l'érythropoïèse à permettre l'entrée du fer nécessaire à la synthèse de l'hémoglobine, mais est capable d'induire des voies de signalisation selon un mécanisme dont les étapes initiales restent à préciser. Je souhaiterais développer quelques pistes concernant les mécanismes éventuels.

## 2.1 Le RTf1 permet l'activation cellulaire

Comme nous l'avons vu ci-dessus, l'activation du RTf1 permet la croissance des érythroblastes en conditions sous-optimales d'Epo. L'implication du RTf dans des voies alternes d'activation cellulaire a été préalablement évoquée, notamment lors du processus d'activation des lymphocytes T (LT). En effet, il a été montré que l'induction de l'expression du RTf n'est pas toujours associée à une augmentation du nombre de sites de liaison pour la Fe-Tf à la surface cellulaire. L'activation des lymphocytes du sang périphérique par la phytohémmagglutinine (PHA) augmente l'expression du RTf et la liaison de la Fe-Tf sur son récepteur. Cependant, le Phorbol Myristate Acetate (PMA) augmente l'expression du RTf, mais pas la liaison de la Fe-Tf sur le RTf (Boldt et al., 1987). D'autre part, l'incubation de certains types cellulaires avec la Fe-Tf, ou des anticorps anti-transferrine, induit une augmentation du calcium intracellulaire (Sainte-Marie et al., 1997). Le RTf1 est habituellement considéré comme un récepteur dont l'expression est secondaire à l'activation lymphocytaire. Cependant, plusieurs équipes utilisant des anticorps anti-RTf1 ont montré un rôle immunomodulateur du RTf1, où celui-ci fournirait un stimulus nécessaire à l'activation des lymphocytes T. Cependant, ce stimulus n'est pas suffisant et nécessite la présence d'autres modulateurs. Par exemple, il a été montré sur la lignée de cellules T HUT-78, qu'un anticorps anti-TFR (J64) pouvait se substituer au PMA, en association avec, soit la PHA, soit des anticorps anti-CD3, soit un ionophore calcique pour la production d'IL-2 (Manger et al., 1986). Il est à noter que cet anticorps se fixe sur un site du RTf différent de celui de la Fe-Tf. D'autres anticorps monoclonaux anti-RTf sont capables d'induire la prolifération des cellules T en présence de concentrations sub-mitogéniques d'esters de phorbol. Ces anticorps induisent également la synthèse d'IL-2 et l'augmentation d'expression membranaire du CD3 (Cano et al., 1990). Dans la N-IgA, la liaison des pIgA1 sur le RTf1 a été impliquée dans la prolifération des cellules mésangiales et le relargage de cytokines, comme l'IL-6 et le TGF- $\beta$ . (Moura et al., 2005).

## 2.2 Quels seraient les effecteurs du RTf1 ?

Il existe peu d'études détaillant les effecteurs du RTf1 au niveau moléculaire. Une seule étude sur les lymphocytes T activés, a décrit le RTf1 activé comme étant associé à la chaîne  $\zeta$  du récepteur aux cellules T (TCR) (Salmeron et al., 1995). Classiquement, le TCR est associé avec deux complexes protéiques différents : l'un formé par les chaînes  $\gamma$ ,  $\delta$ , et  $\epsilon$  du CD3 et l'autre composé par un homodimère de la chaîne  $\zeta$ . La chaîne  $\zeta$  du TCR est physiquement associée à Zap 70 qui est une

protéine tyrosine kinase de la famille Syk. L'activation de cette protéine mène à l'activation de la PLC $\gamma$ 1, la libération de Ca $^{2+}$  intracellulaire et l'activation de protéines de la voie Ras. De manière intéressante, Salmeron *et al* ont suggéré que l'engagement du RTf peut utiliser des protéines de signalisation classiquement décrites comme étant impliquées dans la signalisation d'immunorécepteurs. L'activation des cellules T par un anticorps anti-RTf (FG1/6) induit la phosphorylation de la chaîne  $\zeta$  du TCR et une phosphorylation précoce des protéines, en aval du TCR, sur des résidus tyrosine. Le RTf a été trouvé également physiquement associé à la Zap70. L'ensemble de ces données suggère l'existence d'une voie d'activation cellulaire dépendante du RTf. Dans ce cas, la participation du RTf à une voie de transduction de signal dépendrait de son association à des protéines transductrices telles que la chaîne  $\zeta$ . L'agrégation du RTf induirait une phosphorylation des ITAM des chaînes associées et le recrutement de Zap70, l'activation de la PLC $\gamma$ 1 et la libération de Ca $^{2+}$  intracellulaire. Néanmoins dans cette étude, les expériences d'activation du RTf ont été réalisées avec des anticorps anti-récepteur, et le ligand physiologique du RTf responsable de cette voie d'activation cellulaire reste inconnu. Dans mon travail, j'ai montré que la stimulation du RTf1 par les plgA1 induit deux voies de signalisation et amplifie des signaux induits par le SCF et L'Epo. Cette amplification du signal nous a laissé penser, selon le modèle décrit ci-dessus dans les lymphocytes T, à une coopération directe du RTf1 avec le R-Epo et/ ou le C-KIT à la membrane cellulaire. Le fait que la voie JAK2/Stat5 ne soit pas induite lors de l'activation du RTf1 semble exclure une coopération directe au niveau du R-Epo. D'autre part, le fait que les plgA1 induisent une phosphorylation rapide de ERK1/2 et d'AKT en 3 minutes d'activation semble exclure des mécanismes de coopération au niveau transcriptionnel. Concernant le C-kit, nous avons effectué des expériences préliminaires d'activation du RTf1 par les plgA1 en présence d'un inhibiteur du site catalytique de C-Kit (STI571 ou imatinib), et nous n'avons pas observé d'inhibition des voies de signalisation induite par les plgA1. Ainsi, une interaction directe avec le récepteur semble peu probable, mais reste encore sous investigation par la réalisation, entre autres, d'expériences de co-immunoprécipitations.

Le RTf1 n'est classiquement pas retrouvé dans les radeaux lipidiques, qui sont des domaines de la membrane plasmique impliqués dans la transduction de signal contrairement au RTf2 (Calzolari *et al.*, 2006). Cependant, il est probable que l'activation du RTf1 provoque sa localisation dans les radeaux lipidiques afin de s'associer avec des effecteurs des voies de signalisation cellulaire. Ce phénomène a préalablement été décrit dans les lymphocytes T activés (Batista *et al.*, 2004). En effet, l'équipe de M. Alonso décrit que l'activation des LT ou de la lignée T Jurkat par des anti-CD3 induit une augmentation du nombre de RTf1 à la surface cellulaire, probablement par recrutement des RTf1 présents dans les endosomes, et que cette relocalisation s'effectue au niveau des radeaux lipidiques, plus précisément, au niveau de la synapse immunologique. Le domaine intracytoplasmique du RTf1

est court (67 acides aminés) et possède un motif d'internalisation (YTRF) (Schneider et al., 1984; Schneider and Williams, 1985). Ce domaine possède 7 sérines, 3 thréonines et une tyrosine, qui pourraient participer à la signalisation du récepteur (Figure 32).

```

1  MMDQARSAPG NLFQGEPLSY TRFSLARQVD GNSIVEMKLV AVDEEENADN NTKANVTRPK
61  RCSSSICYGT IAVIVFFLLIG FMIGYLYGCK GVEPKTECER LAGTESPVRE EPGEDFPAAR
121 RLYWDDLKRR LSEKLDSTDF TSTIKLLNEN SYVPREAGSQ KDENLALYVE NQFREFKLSK
181 VWRDQHFVKI QVKDSAQNSV IIVDKNGRLV YLVENPGGYV AYSKAATVTG KLVHANFGTK
241 KDFEDLYTPV NGSIVIVRAG KITFAEKVAN AESLNAIGVL IYMDQTKFPI VNAELSFPGH
301 AHLGTGDPYT PGFPSFNHTQ FPPSRSSGLP NIPVQTISRA AAELKFGNME GDCPSDWKTD
361 STCRMVTSSE KVKLTVSNV LKEIKILNIF GVIKGFVEPD HYVVVGAQRD AWGPGAARKSG
421 VGTALLLKLA QMFSDMVLKD GFQPSRSIIF ASWSAGDFGS VGATEWLEGY LSSLHLKAPT
481 YINLDKAVLG TSNFKVSASP LLYTLIEKTM QNVKHPVTGQ FLYQDSNWS KVEKLTLDNA
541 AFPFLAYSGI PAVSFCFCED TDYPYLGTTM DTYKELIERI PELNKVARAA AEVAGQFVKI
601 LTHDVELNLD YERYNSQLLS FVRDLNQYRA DIKEMGLSLQ WLYSARGDFF RATSRLITDF
661 GNAEKTRFV MKKLNDRVMR VEYHFLSPYV SPKESPFRRV FWGSGSHTLP ALLENLKLK
721 QNNGAFNETL FRNQLALATW TIQGAANALS GDVWDIDNEF

```

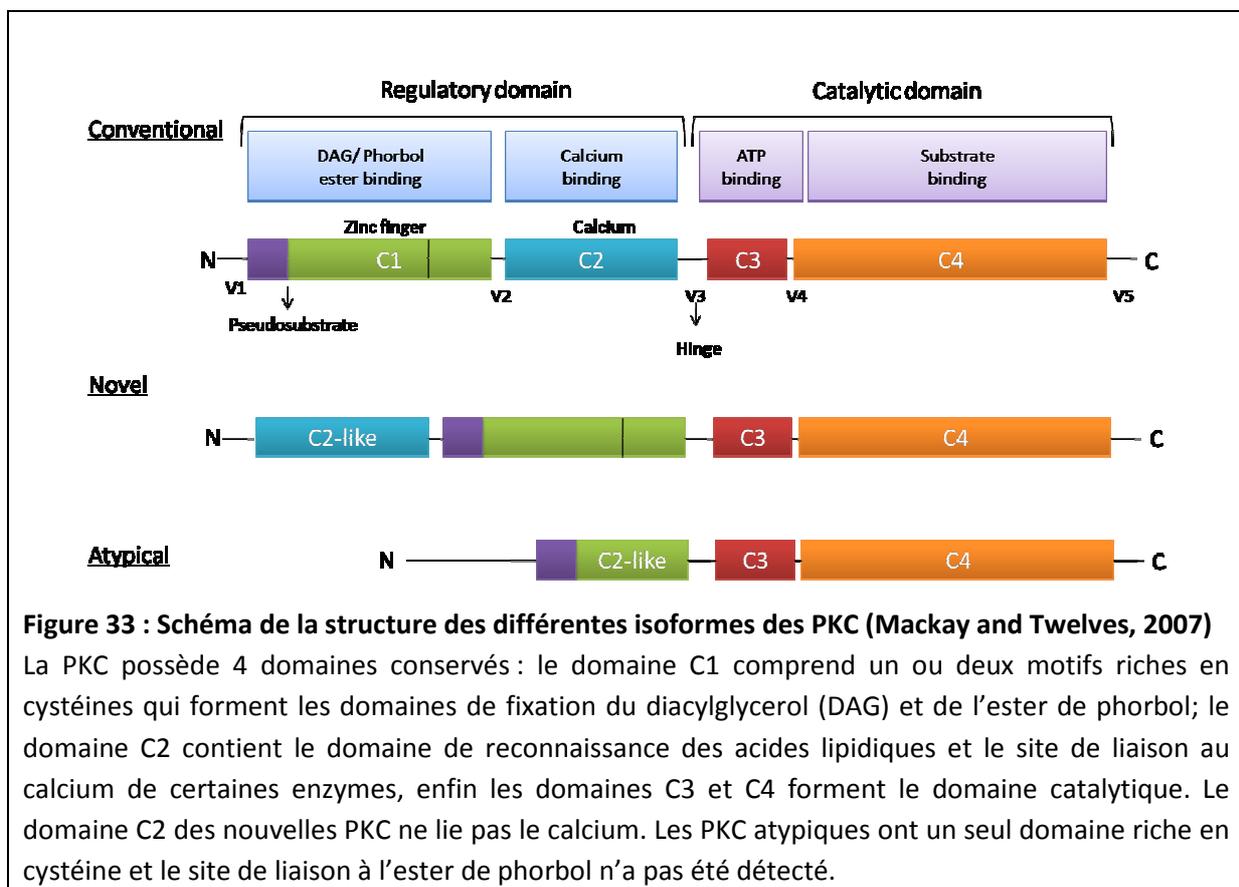
**Figure 32 : Séquence protéique du RTf1**

le domaine cytoplasmique est représenté en bleu, la région transmembranaire est soulignée en bleue et la région en noir représente la région extracellulaire. Les sérines sont indiquées en vert, les thréonines en rouge et les tyrosines en rose

Le RTf1 a déjà été décrit comme étant phosphorylé dans plusieurs types cellulaires, comme les lymphocytes T activés après stimulation du TCR (Salmeron et al., 1995), dans la lignée myélo/monocytaire HL60 (May et al., 1984) et dans la lignée myéloïde à potentialité érythroïde K562 (Klausner et al., 1984). Une étude sur la lignée de carcinome épidermoïde A431 a montré que le RTf1 pouvait être phosphorylé sur la sérine en position 24 (Davis et al., 1986b). Par ailleurs, nous avons recherché à l'aide de programmes informatiques (nephtos, scansite et prosite) quels seraient les meilleurs sites prédictifs de phosphorylation intracytoplasmiques ainsi que les molécules qui pourraient être associées. Les résultats sont hétérogènes selon les programmes utilisés. Cependant les sérines en position 19, 24, 34 et 65 ont été retrouvées comme pouvant être probablement phosphorylés et les protéines impliquées seraient la protéine kinase C (PKC) (position 65 selon scansite) et la protéine caséine kinase 2 (CK2) (position 34 selon prosite). La protéine CK2 est une sérine/thréonine kinase tétramérique, comprenant deux sous-unités catalytiques et deux sous-unités régulatrices, et exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme. Cette kinase possède plus d'une centaine de cibles cellulaires et a été retrouvée impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et la division, ainsi que dans la survie et l'apoptose cellulaire (Litchfield, 2003). La protéine CK2 a été

impliquée dans l'endocytose du RTf1 puisque l'inhibition de son activité par un pseudo-substrat ou par un inhibiteur (H-89) bloque l'endocytose du RTf1 dans les lignées HeLa, A431, 3T3-L1 (Cotlin et al., 1999). Néanmoins, l'action de celle-ci n'a pas été décrite dans l'érythropoïèse.

La PKC englobe une famille de sérines thréonine kinases très bien conservées à travers les espèces et qui participent à la transduction du signal dans de nombreux types cellulaires (Mackay and Twelves, 2007). Il existe 9 gènes pour la PKC, qui codent pour 12 isoformes classées en trois groupes : les PKC conventionnelles (cPKCs; PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ , PKX $\beta$ II and PKC $\gamma$ ), les nouvelles PKC (nPKCs; PKC $\sigma$ , PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\eta$  and PKC $\theta$ ); et les PKC atypiques (aPKCs; PKC $\zeta$  and PKC $\lambda$ )(Mackay and Twelves, 2007). Les différences structurelles entre les classes sont représentées figure 33.



L'implication des PKC dans la signalisation du RTf a déjà été suggérée dans la littérature, mais non formellement démontrée. En effet, il a été montré que le PMA, un puissant activateur des PKC, phosphoryle le RTf1 dans la lignée myélo/monocytaire HL60 et la lignée érythroïde K562 (Klausner et al., 1984; May et al., 1984). D'autre part, comme nous l'avons vu précédemment, l'activation du RTf1 par un anticorps spécifique substitue l'effet du PMA dans l'activation des lymphocytes T, suggérant l'implication de la protéine kinase C dans cette voie d'activation (Manger et al., 1986). Les voies de signalisations impliquées en aval de l'activation des PKC sont peu connues. Néanmoins, les PKC ont

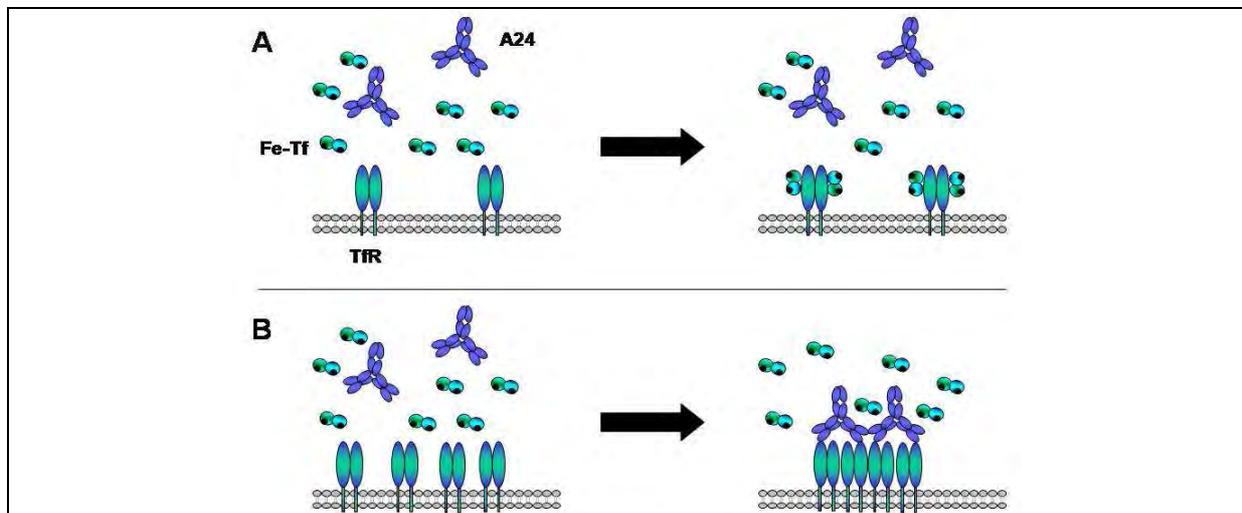
été décrites comme pouvant activer la voie ERK (Marshall, 1996; Ueda et al., 1996), ainsi que la voie PI3K/AKT (Partovian and Simons, 2004). Au niveau hématopoïétique, il existe peu de données de la littérature concernant l'implication des PKC. L'expression des différentes isoformes a été recherchée sur des cellules CD34<sup>+</sup> et sur la lignée pluripotente murine 32D (Bassini et al., 1999). Cette étude a montré que toutes les isoformes recherchées ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  et  $\zeta$ ) sont retrouvées chez les progéniteurs CD34<sup>+</sup> et que, l'inhibition de l'isoforme  $\epsilon$  provoque une augmentation du nombre de colonies érythroïdes (BFU-E), sans modifier la formation de colonies des autres lignages. De façon contradictoire, la même équipe a montré, par la suite, que l'Epo induisait l'expression de la PKC $\epsilon$  et que cette isoforme était impliquée dans la protection des précurseurs érythroïdes contre TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), qui est un ligand du TNF (Mirandola et al., 2006). Selon les auteurs, le mécanisme d'action impliquerait la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 induite par la PKC $\epsilon$ . De façon similaire, PKC $\epsilon$  a été montré comme ayant un rôle anti-apoptotique sur la lignée cytokine-dépendante TF1 privée de facteur de croissance par surexpression de Bcl-2 (Gubina et al., 1998).

En résumé, le RTf n'ayant pas de motif de transduction de signal connu, il doit avoir besoin de molécules associées afin d'induire des signaux de prolifération cellulaire. Les PKC semblent être de bons candidats en tant qu'effecteurs du RTf1. Des études d'inactivation de l'expression des isoformes des PKC candidates sont à mettre en œuvre, afin d'évaluer le rôle direct des PKC dans cette signalisation. Afin de réaliser une recherche plus exhaustive des effecteurs du RTf1, nous souhaiterions réaliser des expériences d'immunoprécipitation du RTf1, lorsque celui-ci est activé et déterminer les molécules associées par spectrométrie de masse. Les effecteurs ainsi découverts seraient ensuite invalidés, afin de préciser leur implication dans l'activation des voies PI3K/AKT et ERK1/2. De plus, nous souhaiterions étudier les variations de transcriptome induites par le RTf1 lorsque celui-ci est activé par ses différents ligands. D'autre part, dans l'objectif de déterminer les résidus de la queue intracytoplasmique impliqués dans la signalisation du RTf1, la génération de différents mutants du RTf1 a été effectuée au sein de l'U699 par Ivan Moura. Plus précisément, plusieurs mutations au niveau de la queue intracytoplasmique du RTf1 ont été réalisées, afin d'invalider des sites de phosphorylation au niveau de résidus sérine (position 24, 34, 63, 65) ou tyrosine (position 20). La transfection de ces mutants sera réalisée sur des cellules exprimant peu le RTf1 et les voies de signalisation, après activation du RTf1, étudiées.

Enfin, il serait intéressant de savoir si des mutations activatrices au niveau de la queue intracytoplasmique du RTf1 sont retrouvées dans des syndromes d'origine érythroïdes prolifératifs, comme des érythroleucémies ou des érythrocytoses ne présentant pas de mutations de JAK2.

## 2.3 Implication des différents ligands dans la signalisation du RTf1

L'activation des voies de signalisation a été obtenue en stimulant le RTf1 avec différents ligands de celui-ci. Nous avons utilisé différentes plgA1 purifiées à partir de sérums de plusieurs patients atteints de myélome à IgA. Ces plgA1 ne présentent pas de différences structurales avec les plgA1 retrouvées dans le sérum (Bonner et al., 2008). Nous avons utilisé aussi un anticorps monoclonal A24 anti-RTf (Moura et al., 2001). Les propriétés de cet anticorps ont largement été étudiées dans un contexte de ciblage du RTf1 en immunothérapie anti-tumorale. En effet, A24 se lie préférentiellement aux cellules exprimant fortement le RTf1, comme les cellules tumorales ou les érythroblastes et inhibe leur prolifération. A24 et la transferrine rentrent en compétition au niveau de leur fixation sur le RTf1. Les cellules quiescentes présentent un nombre restreint de molécules de RTf1 à leur surface et la fixation monovalente de la transferrine (ayant une affinité plus importante pour son récepteur que l'anticorps) empêche la fixation d'A24. A l'opposé, A24 se fixe de manière bivalente sur le RTf1 des cellules malignes ou les érythroblastes, qui expriment une forte densité de récepteur (Figure 34). L'affinité apparente (avidité) d'A24 devient alors plus importante que celle de la transferrine et empêche la fixation de celle-ci sur son récepteur (Moura et al., 2004b).



**Figure 34 : Compétition entre A24 et la Fe-Tf dans la liaison au RTf1 ((Moura et al., 2004b) et pour revue (Callens et al., 2008))**

Des expériences de résonance plasmonique de surface ont été réalisées afin de déterminer les propriétés de liaison d'A24 et du Fe-TF sur le RTf1

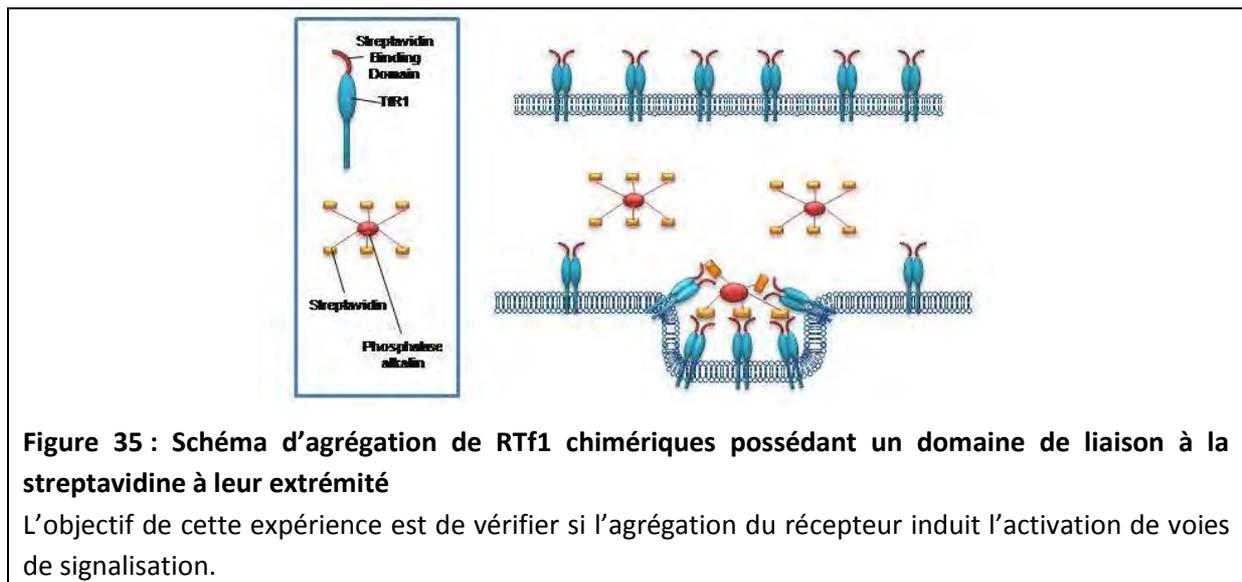
A- Lors d'une faible densité de récepteur à la surface, la liaison du Fe-Tf est favorisée.

B- Lors d'une densité importante de RTf1, le taux de dissociation ( $K_{off}$ ) du complexe A24/RTf1 est 6 fois plus bas. Dans ces conditions, la liaison d'A24 au RTf1 est favorisée.

Nous avons également précédemment montré que la fixation d'A24 sur le RTf induit une endocytose du récepteur vers les compartiments lysosomiaux (Lepelletier et al., 2007). Les cellules traitées par A24 présentent ainsi une diminution drastique du nombre de récepteurs à la surface, qui peut atteindre jusqu'à 90% des récepteurs. En conséquence, les cellules ont une réduction très importante de leur capture du fer. Cette privation en fer semble être le mécanisme majeur impliqué dans l'apoptose, par la dépolarisation de la membrane de la mitochondrie, des cellules ciblées. Nos résultats, indiquant qu'A24 induit l'activation des voies PI3K/AKT et ERK1/2, ne sont qu'en apparence contradiction avec les propriétés précédemment décrites de l'anticorps. En effet, ces voies sont activées à des temps très précoces (3 à 10 minutes) précédant l'internalisation du récepteur. Ainsi, A24 ne peut être évalué *in vitro* et *in vivo* comme un agent modulant positivement l'érythropoïèse, mais permet de montrer que la stimulation spécifique du RTf1 induit des voies de signalisation.

Nous avons aussi testé l'impact de la liaison du principal ligand du RTf, la transferrine, sur les voies d'activation. Pour cela, nous avons dû priver les cellules de transferrine, mais non de fer, en leur ajoutant du fer libre soluble. La stimulation du RTf1 avec la Fe-Tf a provoqué une activation de la voie PI3K/AKT, mais pas de la voie ERK1/2. Les mécanismes précis expliquant cette différence de « *pattern* » d'activation entre la Fe-Tf et les anticorps (plgA1 et A24) ne sont pas élucidés. La présence ou l'absence de différentes molécules transductrices, selon le ligand qui se fixe au récepteur (ligand monovalent *versus* di-ou polyvalent), pourrait expliquer ces différences. Selon cette hypothèse, la liaison d'un anticorps au RTf1 provoquerait une agrégation du récepteur, qui faciliterait l'activation des voies de signalisation. Il existe des données dans la littérature décrivant des fonctions différentes des récepteurs selon leurs degrés d'agrégation. Concernant les IgA1, ce phénomène d'agrégation a été décrit au niveau du FcαRI (Pasquier et al., 2005). Le FcαRI est le seul récepteur aux IgA1 exprimé sur les cellules myéloïdes incluant les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les cellules de Kupffer, les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles (Monteiro and Van De Winkel, 2003). Le FcαRI peut s'associer avec la sous-unité FcRγ, qui contient des motifs ITAM (« immunoreceptor tyrosine-based activation motif ») au niveau de sa partie intra-cytoplasmique. En absence d'agrégation, la liaison du FcαRI par des IgA1 monomériques ou un anticorps anti-FcαRI inhibe les réponses activatrices des récepteurs aux IgG (FcγR) et aux IgE (FcεRI). Ce mécanisme inhibiteur implique le recrutement de la tyrosine phosphatase SHP-1 au niveau du récepteur et la diminution des phosphorylations de Syk, LAT et ERK1/2. A l'opposé, la stimulation du FcαRI par un ligand multimérique provoque l'activation cellulaire, par augmentation de la phosphorylation de Syk et inhibition de la liaison de SHP-1 (Pasquier et al., 2005). Dans notre cas, les IgA1 monomériques se lient très faiblement au RTf1 et n'induisent pas l'activation de voies de signalisation. Par contre, les mIgA1 agrégées avec des anti-IgA1 sont capables d'induire les voies de signalisation PI3K/AKT et

ERK1/2 (expériences non montrées). Afin de vérifier si l'agrégation du RTf1 peut induire des voies de signalisation, nous avons construit une protéine chimérique, constituée du RTf1 fusionné avec un domaine de liaison à la streptavidine au niveau de sa partie C-terminale (expériences réalisées en collaboration avec Meetu Tiwari). Ainsi, l'expression cette protéine de fusion dans des cellules exprimant de faibles taux de RTf1, puis sa stimulation avec de la streptavidine pourraient apporter un élément de réponse à cette question (Figure 35). Cette expérience est actuellement en cours de réalisation.



En résumé, il nous reste à définir les modalités d'activation du RTf1 tant au niveau de la liaison de ses ligands, qu'au niveau intracytoplasmique, par la découverte des molécules effectrices.

### 3 Erythropoïèse chez les patients déficitaires en IgA

Le déficit sélectif en IgA (DIgA) est le déficit immunitaire commun le plus fréquemment retrouvé dans la population, avec une prévalence variable selon les études (1 cas pour 500 à 700 personnes de type caucasien) et probablement sous-estimée du fait de signes cliniques frustrés ((Clark et al., 1983) pour revue voir (Schaffer et al., 1991)). La fréquence de la pathologie est plus importante chez les hommes que chez les femmes (Weber-Mzell et al., 2004), et variable selon l'origine de l'individu. Le DIgA est caractérisé par une concentration sérique d'IgA inférieure à 0,07 g/l, associée à un taux normal d'IgG et d'IgM (Conley et al., 1999). De nombreuses études *in vitro* suggèrent que la baisse de production d'IgA serait causée par un blocage dans la maturation des

cellules B à IgA (Briere et al., 1994; Cassidy et al., 1979), bien qu'un défaut de commutation de classe ait aussi été évoqué (Islam et al., 1994). Récemment, une étude a montré que l'ajout de IL-21 sur des cellules mononuclées de patients atteints de DlgA permet la différenciation de celles-ci en plasmocytes et la restauration de la production d'IgA (Borte et al., 2009). Les patients atteints de DlgA sont souvent asymptomatiques. Les manifestations cliniques, lorsqu'elles sont présentes, sont variables et ont pour cause, l'immunosuppression (infections à répétition), l'atopie (rhinite, asthme, urticaire...) ou, le plus fréquemment, l'auto-immunité (hypothyroïdisme, maladie coeliaque, lupus érythémateux disséminé, purpura d'Henoch- Schönlein). Les patients atteints de DlgA ne présentent pas de manifestations hématologiques, hormis celles pouvant être liées à un problème d'auto-anticorps, comme le purpura thrombopénique idiopathique (PTI) ou l'anémie hémolytique auto-immune (AHA). Bien qu'il n'y ait aucun argument en faveur de cette hypothèse dans la littérature, nous nous sommes tout de même demandé si l'absence d'IgA1 dans le sérum de patients DlgA pouvait avoir un impact sur l'érythropoïèse. Pour cela, nous avons substitué le sérum de nos cultures primaires d'érythroblastes par des sérums de patients de DlgA, ce qui a provoqué une baisse de prolifération associée à une apoptose massive des érythroblastes. L'ajout de pIgA1 a permis de rétablir la croissance et la survie des érythroblastes en condition sous-optimale d'Epo. Nous avons vérifié que les patients, dont nous avons pris les sérums, n'étaient pas anémiques au moment du prélèvement, et retrouvé des taux sériques d'Epo plus élevés chez ceux-ci. Cette constatation reste à être vérifiée sur un nombre plus élevée de patients, mais nous faisons l'hypothèse que les patients DlgA contre-balancent leur déficit en pIgA1 par un taux sanguin plus important d'Epo et, ainsi, ne développent pas d'anémie. Il semblerait donc que la synthèse d'Epo soit modulée par les pIgA1, selon un mécanisme à l'heure actuelle totalement inconnu. Il serait intéressant de voir si les pIgA1 ont une action directe sur les fibroblastes rénaux de la jonction cortico-médullaire qui synthétisent l'Epo, ou si elles modulent l'expression des protéines régulatrices de l'Epo (stabilisation du complexe HIF, dégradation de pVH...). D'autre part, il serait intéressant d'étudier plus précisément l'érythropoïèse chez ces patients, afin de voir si les érythroblastes présentent des propriétés différentes des érythroblastes de volontaires sains, comme une hypersensibilité à l'Epo ou à la transferrine.

## 4 Régulation de la production des plgA1 en situation d'hypoxie

Enfin dans ce mémoire, je montre que le taux d'IgA1p est plus élevé dans la moelle que dans le sérum de volontaires sains et que les taux d'IgA1p sont plus élevés chez des patients soumis à une hypoxie. L'hypoxie est un élément clé dans la régulation de l'érythropoïèse. En effet, les cellules rénales sont fortement sensibles à la pression en oxygène et vont produire plus d'érythropoïétine lorsque la pO<sub>2</sub> est diminuée. Ainsi, chez les personnes soumises à une situation hypoxique (montée en altitude, pathologies respiratoires comme les broncho-pneumopathies chroniques obstructives ou les syndromes d'apnée du sommeil...), il est observé une forte augmentation des taux d'érythropoïétine. Cependant, ces taux diminuent rapidement alors que l'hématocrite est maintenu, laissant suggérer que d'autres facteurs que l'érythropoïétine interviennent dans la stimulation de l'érythropoïèse. Nos résultats laissent penser que les plgA1 pourraient être un de ces facteurs permettant le maintien de l'érythropoïèse, lorsque les taux d'érythropoïétine sont diminués. Il nous reste maintenant à caractériser les mécanismes de l'augmentation des IgA1p lors de l'hypoxie. Nous souhaiterions par exemple évaluer si, en situation d'hypoxie, il existe une orientation de la production des immunoglobulines par les plasmocytes vers les plgA1. Une étude chez l'homme semble étayer cette hypothèse (Meehan et al., 1988). En effet, un protocole de l'armée américaine a étudié les paramètres hématologiques et immunologiques de 8 volontaires sains, placés pendant 28 jours dans un caisson hyperbare correspondant à une montée en altitude à 7620 mètres. Les bilans réalisés ont montré en condition d'hypoxie, une augmentation des taux sériques d'IgA et d'IgM mais pas d'IgG, ainsi qu'aucune variation des IgA sécrétoires recueillies dans des sécrétions nasales. Le fait que l'augmentation des concentrations d'immunoglobulines ne concerne que les IgA et les IgM sériques laisse penser à une modulation de la chaîne J en condition d'hypoxie.

Le gène de la *chaîne J* est « exprimé » uniquement dans les lymphocytes B totalement différenciés en plasmocytes (Koshland, 1983). La protéine est incorporée dans les pentamères d'IgM et les dimères ou polymères d'IgA, juste avant la sécrétion de ceux-ci par les plasmocytes (Johansen et al., 2001; Niles et al., 1995). Le promoteur de la chaîne J est très peu étendu et doit coopérer avec son *enhancer* pour transcrire le gène de façon efficace (Kang et al., 1998; Lansford et al., 1992). L'*enhancer* agit sur éléments régulateurs du promoteur en interagissant avec des facteurs de liaison ou leurs co-facteurs. Ces interactions *enhancer*-promoteur facilitent l'assemblage d'un complexe de préinitiation de transcription sur le promoteur (Carey, 1998). Une étude récente, portant spécifiquement sur l'activité *enhancer*-promoteur de la chaîne J, a montré qu'uniquement MEF-2 et

PU-1 peuvent se lier au promoteur, et que l'abolition des sites de liaison à ces facteurs inhibe l'activité du promoteur (Lim et al., 2009). Dans notre cas, il serait intéressant de savoir si le complexe *enhancer*-promoteur de la chaîne J peut être régulé par l'hypoxie. Il n'existe pas d'HRE au niveau de ces régions, ce qui exclut l'action directe de HIF sur l'expression de la chaîne J. D'autre part, MEF-2 et PU-1 ne sont pas cités dans la littérature comme étant régulés par l'hypoxie. C'est pourquoi, nous nous intéressons à un facteur de croissance impliqué dans la commutation de classe des IgA et modulé par l'hypoxie, comme le *transforming growth factor-β* (TGF-β).

Le TGF-β est protéine pléiotropique largement conservée à travers les espèces, qui possède trois isoformes TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 ayant le même effet sur les cellules immunitaires *in vitro*. Le TGF-β, par sa liaison à l'un de ses nombreux récepteurs serine/thréonine kinases, active la voie des SMAD qui migrent dans le noyau et permettent la régulation transcriptionnelle de gènes cibles. Le TGF-β possède un rôle unique dans la production des IgA, et les souris présentant un blocage de la signalisation du TGF-β dans la lignée B sont pratiquement dépourvues d'IgA (Cazac and Roes, 2000). En effet, le TGF-β induit la commutation de classe vers les IgA par augmentation des transcrits germinatifs α, du fait de la présence au niveau de leur promoteur de motifs de réponse au TGF-β (Lin et al., 1991; Shockett and Stavnezer, 1991). La production de TGF-β est modulée par l'hypoxie, mais semble varier selon les isotypes. Le TGF-β3 a des HRE en amont de son gène (Schaffer et al., 2003), ce qui ne semble pas être le cas du TGF-β1, bien que l'expression de celui-ci soit induite (Leungwattanakij et al., 2003; Norman et al., 2000) inchangée (Scheid et al., 2000; Zhang et al., 2003a) par l'hypoxie selon le type cellulaire. Au niveau endothélial, l'hypoxie induit la production de TGF-β2 par activation des smads (Zhang et al., 2003a).

Afin d'évaluer les variations de proportion de pIgA1 parmi les IgA1 totales en condition d'hypoxie, nous souhaitons différencier *in vitro* des lymphocytes B en plasmocytes en conditions de normoxie et d'hypoxie pour étudier les variations de sécrétion de pIgA1. D'autre part, nous proposons d'évaluer la régulation de l'activité du promoteur de la chaîne J par la technique du gène rapporteur luciférase en conditions de normoxie et d'hypoxie, ainsi qu'en présence ou non de TGF-β. Les IgA murines étant toutes polymériques, l'étude de variation de proportion semble impossible. Néanmoins, les variations de sécrétions de la chaîne J, et donc de polymérisation des IgA chez les α1KI, peuvent être envisageables.

## 5 Rôle de la liaison RTf1/pIgA dans d'autres modèles physiopathologiques ?

Le travail que j'ai effectué lors de ma thèse concerne la régulation positive de l'érythropoïèse par les pIgA1. Nous nous sommes intéressés aux érythroblastes, car ce sont les cellules physiologiques qui expriment fortement le RTf1 et nous avons montré que l'activation du RTf1 amplifie les voies de signalisation induites par les deux principaux récepteurs à facteurs de croissance situés sur les érythroblastes. Il serait intéressant d'évaluer si cet aspect régulateur du RTf1, via la liaison des pIgA1, peut être élargi à d'autres types cellulaires physiologiques exprimant le RTf1, comme les lymphocytes T activés, les cellules dendritiques. Au niveau pathologique, nous souhaiterions savoir si le RTf1 joue un rôle oncogénique au-delà de son rôle dans l'entrée du fer sur les cellules tumorales. En effet, comme cela a largement été décrit, les cellules tumorales à fort potentiel prolifératif expriment fortement le RTf1 (Faulk et al., 1980). D'autre part, un grand nombre de cellules tumorales expriment des récepteurs à tyrosines kinases responsables d'activation anormales de voies de signalisation cellulaires. Par exemple, dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), il est retrouvé des mutations essentiellement sur les récepteurs à tyrosine kinase de classe III (C-Kit, PDGF-R, FLT3) et le MCSF-R. Le récepteur FLT3 est activé de façon constitutive dans 40% des LAM suite à des duplications internes dans la région juxta-membranaire ou, plus rarement, à des mutations dans le site catalytique. Ces mutations sont associées à un pronostic péjoratif (Gilliland and Griffin, 2002). Le récepteur C-Kit est exprimé dans 85% des LAM. Des mutations conduisant à son activation constitutive sont rarement retrouvées dans les LAM (<5%) à la différence de certains cancers et en particulier, les tumeurs gastro-intestinales stromales (GIST) et les mastocytoses. Il serait intéressant de savoir si la présence de pIgA1 à proximité de certaines tumeurs ou de blastes permet une prolifération accrue des cellules tumorales par amplification des voies de signalisation ou s'il existe des mutations activatrices du RTf1, comme je l'évoquais dans les PV et les érythroleucémies. D'autre part, la proportion de pIgA1 par rapport à la quantité totale d'IgA1 n'a toujours été étudiée que chez des volontaires sains et il serait intéressant de voir si celle-ci est dérégulée chez des patients atteints de pathologies tumorales, en particulier celles d'origine médullaires (myélodysplasies, myélofibroses, etc...).

En conclusion, ce travail met en évidence un nouveau mécanisme d'action, consécutif au ciblage du RTf1 dans le traitement de l'anémie. La stimulation du RTf1 par les pIgA1 permet une récupération plus rapide de l'anémie aiguë par sensibilisation des érythroblastes à l'Epo. Au vu de ces

résultats, nous pouvons penser que des agonistes du RTf1 pourraient constituer une nouvelle classe d'agents stimulateurs de l'érythropoïèse. Ainsi, le RTf1 ne doit plus être considéré comme simple molécule de transport du fer lié à la transferrine, mais comme un récepteur impliqué dans la régulation cellulaire par activation de voies majeures de prolifération et de survie.

# Bibliographie

- Abkowitz, J. L., Hume, H., Yancik, S. A., Bennett, L. G., and Matsumoto, A. M. (1996). Stem cell factor serum levels may not be clinically relevant. *Blood* *87*, 4017-4018.
- Abraham, J., Kwong, J. A., Albarino, C. G., Lu, J. G., Radoshitzky, S. R., Salazar-Bravo, J., Farzan, M., Spiropoulou, C. F., and Choe, H. (2009). Host-species transferrin receptor 1 orthologs are cellular receptors for nonpathogenic new world clade B arenaviruses. *PLoS Pathog* *5*, e1000358.
- Akin, C., and Metcalfe, D. D. (2004). The biology of Kit in disease and the application of pharmacogenetics. *J Allergy Clin Immunol* *114*, 13-19; quiz 20.
- Alberghini, A., Recalcati, S., Tacchini, L., Santambrogio, P., Campanella, A., and Cairo, G. (2005). Loss of the von Hippel Lindau tumor suppressor disrupts iron homeostasis in renal carcinoma cells. *J Biol Chem* *280*, 30120-30128.
- Anagnostou, A., Liu, Z., Steiner, M., Chin, K., Lee, E. S., Kessimian, N., and Noguchi, C. T. (1994). Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 3974-3978.
- Andrews, N. C. (2008). Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood* *112*, 219-230.
- Angelillo-Scherrer, A., Burnier, L., Lambrechts, D., Fish, R. J., Tjwa, M., Plaisance, S., Sugamele, R., DeMol, M., Martinez-Soria, E., Maxwell, P. H., *et al.* (2008). Role of Gas6 in erythropoiesis and anemia in mice. *J Clin Invest* *118*, 583-596.
- Arany, Z., Huang, L. E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M. A., Bunn, H. F., and Livingston, D. M. (1996). An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 12969-12973.
- Arcasoy, M. O., Amin, K., Karayal, A. F., Chou, S. C., Raleigh, J. A., Varia, M. A., and Haroon, Z. A. (2002). Functional significance of erythropoietin receptor expression in breast cancer. *Lab Invest* *82*, 911-918.
- Arcasoy, M. O., and Jiang, X. (2005). Co-operative signalling mechanisms required for erythroid precursor expansion in response to erythropoietin and stem cell factor. *Br J Haematol* *130*, 121-129.
- Ardehali, R., Shi, L., Janatova, J., Mohammad, S. F., and Burns, G. L. (2003). The inhibitory activity of serum to prevent bacterial adhesion is mainly due to apo-transferrin. *J Biomed Mater Res A* *66*, 21-28.
- Arnold, R., Calvo, W., Heymer, B., Schmeiser, T., Heimpel, H., and Kubanek, B. (1985). Extramedullary haemopoiesis after bone marrow transplantation. *Scand J Haematol* *34*, 9-12.

- Arock, M. (2004). Mastocytoses : classification, diagnostic biologique et traitement. *Ann Biol Clin (Paris)* 62, 657-669.
- Aucouturier, P., Duarte, F., Mihaesco, E., Pineau, N., and Preud'homme, J. L. (1988). Jacalin, the human IgA1 and IgD precipitating lectin, also binds IgA2 of both allotypes. *J Immunol Methods* 113, 185-191.
- Aucouturier, P., Mihaesco, E., Mihaesco, C., and Preud'homme, J. L. (1987). Characterization of jacalin, the human IgA and IgD binding lectin from jackfruit. *Mol Immunol* 24, 503-511.
- Aucouturier, P., Musset, L., Itoh, Y., Ko, Y. C., Silvain, C., and Preud'homme, L. (1992). Isotypic and allotypic analysis with monoclonal antibodies and jacalin of 309 serum monoclonal IgA from French and Japanese myeloma patients. *Immunol Lett* 32, 31-34.
- Auerbach, M., Ballard, H., Trout, J. R., McIlwain, M., Ackerman, A., Bahrain, H., Balan, S., Barker, L., and Rana, J. (2004). Intravenous iron optimizes the response to recombinant human erythropoietin in cancer patients with chemotherapy-related anemia: a multicenter, open-label, randomized trial. *J Clin Oncol* 22, 1301-1307.
- Bakker, W. J., Blazquez-Domingo, M., Kolbus, A., Besooyen, J., Steinlein, P., Beug, H., Coffey, P. J., Lowenberg, B., von Lindern, M., and van Dijk, T. B. (2004). FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. *J Cell Biol* 164, 175-184.
- Bao, H., Jacobs-Helber, S. M., Lawson, A. E., Penta, K., Wickrema, A., and Sawyer, S. T. (1999). Protein kinase B (c-Akt), phosphatidylinositol 3-kinase, and STAT5 are activated by erythropoietin (EPO) in HCD57 erythroid cells but are constitutively active in an EPO-independent, apoptosis-resistant subclone (HCD57-SREI cells). *Blood* 93, 3757-3773.
- Bard-Chapeau, E. A., Hevener, A. L., Long, S., Zhang, E. E., Olefsky, J. M., and Feng, G. S. (2005). Deletion of Gab1 in the liver leads to enhanced glucose tolerance and improved hepatic insulin action. *Nat Med* 11, 567-571.
- Bassini, A., Zauli, G., Migliaccio, G., Migliaccio, A. R., Pascuccio, M., Pierpaoli, S., Guidotti, L., Capitani, S., and Vitale, M. (1999). Lineage-restricted expression of protein kinase C isoforms in hematopoiesis. *Blood* 93, 1178-1188.
- Batista, A., Millan, J., Mittelbrunn, M., Sanchez-Madrid, F., and Alonso, M. A. (2004). Recruitment of transferrin receptor to immunological synapse in response to TCR engagement. *J Immunol* 172, 6709-6714.
- Bauer, A., Mikulits, W., Lagger, G., Stengl, G., Brosch, G., and Beug, H. (1998). The thyroid hormone receptor functions as a ligand-operated developmental switch between proliferation and differentiation of erythroid progenitors. *Embo J* 17, 4291-4303.
- Beguín, Y. (2003). Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta* 329, 9-22.
- Bennett, M. J., Lebron, J. A., and Bjorkman, P. J. (2000). Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. *Nature* 403, 46-53.

- Berardi, A. C., Wang, A., Levine, J. D., Lopez, P., and Scadden, D. T. (1995). Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science* *267*, 104-108.
- Berger, J. (2007). Phenylhydrazine haematotoxicity. *J Appl Biomed* *5*, 125-130.
- Berger, J., and Hinglais, N. (1968). Les dépôts intercapillaires d'IgA-IgG. *J Urol Nephrol (Paris)* *74*, 694-695.
- Bessis, M. (1958). L'îlot érythroblastique. Unité fonctionnelle de la moelle osseuse. *Rev Hematol* *13*, 8-11.
- Birkmann, J., Oez, S., Smetak, M., Kaiser, G., Kappauf, H., and Gallmeier, W. M. (1997). Effects of recombinant human thrombopoietin alone and in combination with erythropoietin and early-acting cytokines on human mobilized purified CD34+ progenitor cells cultured in serum-depleted medium. *Stem Cells* *15*, 18-32.
- Blanc, L., De Gassart, A., Geminard, C., Bette-Bobillo, P., and Vidal, M. (2005). Exosome release by reticulocytes--an integral part of the red blood cell differentiation system. *Blood Cells Mol Dis* *35*, 21-26.
- Blank, U., Karlsson, G., and Karlsson, S. (2008). Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood* *111*, 492-503.
- Boehm, M. K., Woof, J. M., Kerr, M. A., and Perkins, S. J. (1999). The Fab and Fc fragments of IgA1 exhibit a different arrangement from that in IgG: a study by X-ray and neutron solution scattering and homology modelling. *J Mol Biol* *286*, 1421-1447.
- Boldt, D. H., Phillips, J. L., and Alcantara, O. (1987). Disparity between expression of transferrin receptor ligand binding and non-ligand binding domains on human lymphocytes. *J Cell Physiol* *132*, 331-336.
- Bonner, A., Almogren, A., Furtado, P. B., Kerr, M. A., and Perkins, S. J. (2009). The nonplanar secretory IgA2 and near planar secretory IgA1 solution structures rationalize their different mucosal immune responses. *J Biol Chem* *284*, 5077-5087.
- Bonner, A., Furtado, P. B., Almogren, A., Kerr, M. A., and Perkins, S. J. (2008). Implications of the near-planar solution structure of human myeloma dimeric IgA1 for mucosal immunity and IgA nephropathy. *J Immunol* *180*, 1008-1018.
- Borte, S., Pan-Hammarstrom, Q., Liu, C., Sack, U., Borte, M., Wagner, U., Graf, D., and Hammarstrom, L. (2009). Interleukin-21 restores immunoglobulin production ex vivo in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Blood*.
- Boudot, C., Dasse, E., Lambert, E., Kadri, Z., Mayeux, P., Chretien, S., Haye, B., Billat, C., and Petitfrere, E. (2003). Involvement of the Src kinase Lyn in phospholipase C-gamma 2 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activation in Epo signalling. *Biochem Biophys Res Commun* *300*, 437-442.
- Bouscary, D., Pene, F., Claessens, Y. E., Muller, O., Chretien, S., Fontenay-Roupie, M., Gisselbrecht, S., Mayeux, P., and Lacombe, C. (2003). Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood* *101*, 3436-3443.

- Brandtzaeg, P. (1975). Purification of J chain after mild reduction of human immunoglobulins. *Scand J Immunol* 4, 309-320.
- Brandtzaeg, P. (1976). Complex formation between secretory component and human immunoglobulins related to their content of J chain. *Scand J Immunol* 5, 411-419.
- Brannan, C. I., Lyman, S. D., Williams, D. E., Eisenman, J., Anderson, D. M., Cosman, D., Bedell, M. A., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (1991). Steel-Dickie mutation encodes a c-kit ligand lacking transmembrane and cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4671-4674.
- Briere, F., Bridon, J. M., Chevet, D., Souillet, G., Bienvenu, F., Guret, C., Martinez-Valdez, H., and Banchereau, J. (1994). Interleukin 10 induces B lymphocytes from IgA-deficient patients to secrete IgA. *J Clin Invest* 94, 97-104.
- Brines, M. L., Ghezzi, P., Keenan, S., Agnello, D., de Lanerolle, N. C., Cerami, C., Itri, L. M., and Cerami, A. (2000). Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10526-10531.
- Broudy, V. C. (1997). Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 90, 1345-1364.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., and Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Bunn, H. F. (2007). New agents that stimulate erythropoiesis. *Blood* 109, 868-873.
- Callens, C., Moura, I. C., Lepelletier, Y., Coulon, S., Renand, A., Dussiot, M., Ghez, D., Benhamou, M., Monteiro, R. C., Bazarbachi, A., and Hermine, O. (2008). Recent advances in adult T-cell leukemia therapy: focus on a new anti-transferrin receptor monoclonal antibody. *Leukemia* 22, 42-48.
- Calvillo, L., Latini, R., Kajstura, J., Leri, A., Anversa, P., Ghezzi, P., Salio, M., Cerami, A., and Brines, M. (2003). Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4802-4806.
- Calzolari, A., Deaglio, S., Sposi, N. M., Petrucci, E., Morsilli, O., Gabbianelli, M., Malavasi, F., Peschle, C., and Testa, U. (2004). Transferrin receptor 2 protein is not expressed in normal erythroid cells. *Biochem J* 381, 629-634.
- Calzolari, A., Oliviero, I., Deaglio, S., Mariani, G., Biffoni, M., Sposi, N. M., Malavasi, F., Peschle, C., and Testa, U. (2007). Transferrin receptor 2 is frequently expressed in human cancer cell lines. *Blood Cells Mol Dis* 39, 82-91.
- Calzolari, A., Raggi, C., Deaglio, S., Sposi, N. M., Stafsnes, M., Fecchi, K., Parolini, I., Malavasi, F., Peschle, C., Sargiacomo, M., and Testa, U. (2006). TfR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *J Cell Sci* 119, 4486-4498.
- Camaschella, C., Roetto, A., Cali, A., De Gobbi, M., Garozzo, G., Carella, M., Majorano, N., Totaro, A., and Gasparini, P. (2000). The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet* 25, 14-15.

- Cano, E., Pizarro, A., Redondo, J. M., Sanchez-Madrid, F., Bernabeu, C., and Fresno, M. (1990). Induction of T cell activation by monoclonal antibodies specific for the transferrin receptor. *Eur J Immunol* *20*, 765-770.
- Cantor, A. B., and Orkin, S. H. (2002). Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* *21*, 3368-3376.
- Carey, M. (1998). The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell* *92*, 5-8.
- Caro, J., Brown, S., Miller, O., Murray, T., and Erslev, A. J. (1979). Erythropoietin levels in uremic nephric and anephric patients. *J Lab Clin Med* *93*, 449-458.
- Caro, J. J., Salas, M., Ward, A., and Goss, G. (2001). Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: a systemic, quantitative review. *Cancer* *91*, 2214-2221.
- Casadevall, N., Gisselbrecht, C., and Rossert, J. (2008). Les agents stimulant l'érythropoïèse, J. Libbey, ed.
- Cassidy, J. T., Oldham, G., and Platts-Mills, T. A. (1979). Functional assessment of a B cell defect in patients with selective IgA deficiency. *Clin Exp Immunol* *35*, 296-305.
- Castrillon, D. H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J. W., and DePinho, R. A. (2003). Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* *301*, 215-218.
- Cazac, B. B., and Roes, J. (2000). TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity* *13*, 443-451.
- Chabot, B., Stephenson, D. A., Chapman, V. M., Besmer, P., and Bernstein, A. (1988). The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* *335*, 88-89.
- Chen, T. K., Smith, L. M., Gebhardt, D. K., Birrer, M. J., and Brown, P. H. (1996). Activation and inhibition of the AP-1 complex in human breast cancer cells. *Mol Carcinog* *15*, 215-226.
- Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S. C., and Walz, T. (2004). Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell* *116*, 565-576.
- Chin, H., Arai, A., Wakao, H., Kamiyama, R., Miyasaka, N., and Miura, O. (1998). Lyn physically associates with the erythropoietin receptor and may play a role in activation of the Stat5 pathway. *Blood* *91*, 3734-3745.
- Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J. C., and Keller, G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* *125*, 725-732.
- Chu, X., Cheung, J. Y., Barber, D. L., Birnbaumer, L., Rothblum, L. I., Conrad, K., Abrasonis, V., Chan, Y. M., Stahl, R., Carey, D. J., and Miller, B. A. (2002). Erythropoietin modulates calcium influx through TRPC2. *J Biol Chem* *277*, 34375-34382.
- Chu, X., Tong, Q., Cheung, J. Y., Wozney, J., Conrad, K., Mazack, V., Zhang, W., Stahl, R., Barber, D. L., and Miller, B. A. (2004). Interaction of TRPC2 and TRPC6 in erythropoietin modulation of calcium influx. *J Biol Chem* *279*, 10514-10522.

- Chuang, P. D., and Morrison, S. L. (1997). Elimination of N-linked glycosylation sites from the human IgA1 constant region: effects on structure and function. *J Immunol* *158*, 724-732.
- Clark, J. A., Calliccoat, P. A., Brenner, N. A., Bradley, C. A., and Smith, D. M., Jr. (1983). Selective IgA deficiency in blood donors. *Am J Clin Pathol* *80*, 210-213.
- Cole, J., Ertoy, D., Lin, H., Sutliff, R. L., Ezan, E., Guyene, T. T., Capecchi, M., Corvol, P., and Bernstein, K. E. (2000). Lack of angiotensin II-facilitated erythropoiesis causes anemia in angiotensin-converting enzyme-deficient mice. *J Clin Invest* *106*, 1391-1398.
- Conley, M. E., Chan, M. A., and Sigal, N. H. (1987). In vitro regulation of IgA subclass production. III. Selective transformation of IgA1 producing cells by Epstein-Barr virus. *J Immunol* *138*, 1403-1407.
- Conley, M. E., Notarangelo, L. D., and Etzioni, A. (1999). Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol* *93*, 190-197.
- Conley, M. E., Rohrer, J., and Minegishi, Y. (2000). X-linked agammaglobulinemia. *Clin Rev Allergy Immunol* *19*, 183-204.
- Cook, J. D., Skikne, B. S., and Baynes, R. D. (1993). Serum transferrin receptor. *Annu Rev Med* *44*, 63-74.
- Cooperman, S. S., Meyron-Holtz, E. G., Olivierre-Wilson, H., Ghosh, M. C., McConnell, J. P., and Rouault, T. A. (2005). Microcytic anemia, erythropoietic protoporphyria, and neurodegeneration in mice with targeted deletion of iron-regulatory protein 2. *Blood* *106*, 1084-1091.
- Coppo, R., and Amore, A. (2004). Aberrant glycosylation in IgA nephropathy (IgAN). *Kidney Int* *65*, 1544-1547.
- Costa, J. J., Demetri, G. D., Harrist, T. J., Dvorak, A. M., Hayes, D. F., Merica, E. A., Menchaca, D. M., Gringeri, A. J., Schwartz, L. B., and Galli, S. J. (1996). Recombinant human stem cell factor (kit ligand) promotes human mast cell and melanocyte hyperplasia and functional activation in vivo. *J Exp Med* *183*, 2681-2686.
- Cotlin, L. F., Siddiqui, M. A., Simpson, F., and Collawn, J. F. (1999). Casein kinase II activity is required for transferrin receptor endocytosis. *J Biol Chem* *274*, 30550-30556.
- Coulon, S., Vandekerckhove, J., Dussiot, M., Callens, C., Suarez, F., Kersual, J., Asnafi, V., Belaid, Z., Courtois, G., Giraudier, S., *et al.* (2007). Human erythroleukemia: is the two-hit model of mouse leukemogenesis valid in human disease? *Leukemia* *21*, 2212-2214.
- Courtney, A. E., and Maxwell, A. P. (2008). Critiques of clinical guidelines in nephrology: anaemia. *Nephron Clin Pract* *110*, c115-125.
- Crago, S. S., Kutteh, W. H., Moro, I., Allansmith, M. R., Radl, J., Haaijman, J. J., and Mestecky, J. (1984). Distribution of IgA1-, IgA2-, and J chain-containing cells in human tissues. *J Immunol* *132*, 16-18.

- Csete, M., Rodriguez, L., Wilcox, M., and Chadalavada, S. (2004). Erythropoietin receptor is expressed on adult rat dopaminergic neurons and erythropoietin is neurotrophic in cultured dopaminergic neuroblasts. *Neurosci Lett* 359, 124-126.
- D'Amico, G. (2000). Natural history of idiopathic IgA nephropathy: role of clinical and histological prognostic factors. *Am J Kidney Dis* 36, 227-237.
- Damen, J. E., Wakao, H., Miyajima, A., Krosi, J., Humphries, R. K., Cutler, R. L., and Krystal, G. (1995). Tyrosine 343 in the erythropoietin receptor positively regulates erythropoietin-induced cell proliferation and Stat5 activation. *Embo J* 14, 5557-5568.
- Daniels, T. R., Delgado, T., Helguera, G., and Penichet, M. L. (2006a). The transferrin receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells. *Clin Immunol* 121, 159-176.
- Daniels, T. R., Delgado, T., Rodriguez, J. A., Helguera, G., and Penichet, M. L. (2006b). The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin Immunol* 121, 144-158.
- Davies, P. S., and Enns, C. A. (2004). Expression of the hereditary hemochromatosis protein HFE increases ferritin levels by inhibiting iron export in HT29 cells. *J Biol Chem* 279, 25085-25092.
- Davies, P. S., Zhang, A. S., Anderson, E. L., Roy, C. N., Lampson, M. A., McGraw, T. E., and Enns, C. A. (2003). Evidence for the interaction of the hereditary haemochromatosis protein, HFE, with the transferrin receptor in endocytic compartments. *Biochem J* 373, 145-153.
- Davis, J. Q., Dansereau, D., Johnstone, R. M., and Bennett, V. (1986a). Selective externalization of an ATP-binding protein structurally related to the clathrin-uncoating ATPase/heat shock protein in vesicles containing terminal transferrin receptors during reticulocyte maturation. *J Biol Chem* 261, 15368-15371.
- Davis, R. J., Johnson, G. L., Kelleher, D. J., Anderson, J. K., Mole, J. E., and Czech, M. P. (1986b). Identification of serine 24 as the unique site on the transferrin receptor phosphorylated by protein kinase C. *J Biol Chem* 261, 9034-9041.
- De Maria, R., Zeuner, A., Eramo, A., Domenichelli, C., Bonci, D., Grignani, F., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Testa, U., and Peschle, C. (1999). Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 401, 489-493.
- Deaglio, S., Capobianco, A., Cali, A., Bellora, F., Alberti, F., Righi, L., Sapino, A., Camaschella, C., and Malavasi, F. (2002). Structural, functional, and tissue distribution analysis of human transferrin receptor-2 by murine monoclonal antibodies and a polyclonal antiserum. *Blood* 100, 3782-3789.
- Djordjevic, S., and Driscoll, P. C. (2002). Structural insight into substrate specificity and regulatory mechanisms of phosphoinositide 3-kinases. *Trends Biochem Sci* 27, 426-432.
- Do, S. I., Enns, C., and Cummings, R. D. (1990). Human transferrin receptor contains O-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* 265, 114-125.
- Dolznic, H., Boulme, F., Stangl, K., Deiner, E. M., Mikulits, W., Beug, H., and Mullner, E. W. (2001). Establishment of normal, terminally differentiating mouse erythroid progenitors: molecular characterization by cDNA arrays. *Faseb J* 15, 1442-1444.

Drakesmith, H., Sweetland, E., Schimanski, L., Edwards, J., Cowley, D., Ashraf, M., Bastin, J., and Townsend, A. R. (2002). The hemochromatosis protein HFE inhibits iron export from macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15602-15607.

Duchez, S., Amin, R., Cogné, N., Delpy, L., Sirac, C., Pascal, V., Corthésy, B., and Cogné, M. Premature replacement of mu with alpha immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. en révision.

Duncan, A. R., and Winter, G. (1988). The binding site for C1q on IgG. *Nature* 332, 738-740.

Eisenstein, R. S. (2000). Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu Rev Nutr* 20, 627-662.

Elliott, S., Busse, L., Bass, M. B., Lu, H., Sarosi, I., Sinclair, A. M., Spahr, C., Um, M., Van, G., and Begley, C. G. (2006). Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression. *Blood* 107, 1892-1895.

Emerson, S. G., Thomas, S., Ferrara, J. L., and Greenstein, J. L. (1989). Developmental regulation of erythropoiesis by hematopoietic growth factors: analysis on populations of BFU-E from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver. *Blood* 74, 49-55.

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

Faulk, W. P., Hsi, B. L., and Stevens, P. J. (1980). Transferrin and transferrin receptors in carcinoma of the breast. *Lancet* 2, 390-392.

Feder, J. N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D. A., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, R., Jr., Ellis, M. C., Fullan, A., *et al.* (1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 13, 399-408.

Feder, J. N., Penny, D. M., Irrinki, A., Lee, V. K., Lebron, J. A., Watson, N., Tsuchihashi, Z., Sigal, E., Bjorkman, P. J., and Schatzman, R. C. (1998). The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1472-1477.

Feder, J. N., Tsuchihashi, Z., Irrinki, A., Lee, V. K., Mapa, F. A., Morikang, E., Prass, C. E., Starnes, S. M., Wolff, R. K., Parkkila, S., *et al.* (1997). The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *J Biol Chem* 272, 14025-14028.

Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M., and Philipsen, S. (2005). GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 25, 1215-1227.

Fishbane, S., Frei, G. L., and Maesaka, J. (1995). Reduction in recombinant human erythropoietin doses by the use of chronic intravenous iron supplementation. *Am J Kidney Dis* 26, 41-46.

Flanagan, J. G., Chan, D. C., and Leder, P. (1991). Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant. *Cell* 64, 1025-1035.

- Fleming, M. D., Romano, M. A., Su, M. A., Garrick, L. M., Garrick, M. D., and Andrews, N. C. (1998). Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 1148-1153.
- Fleming, R. E., Ahmann, J. R., Migas, M. C., Waheed, A., Koeffler, H. P., Kawabata, H., Britton, R. S., Bacon, B. R., and Sly, W. S. (2002). Targeted mutagenesis of the murine transferrin receptor-2 gene produces hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 10653-10658.
- Fleming, R. E., Migas, M. C., Holden, C. C., Waheed, A., Britton, R. S., Tomatsu, S., Bacon, B. R., and Sly, W. S. (2000). Transferrin receptor 2: continued expression in mouse liver in the face of iron overload and in hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 2214-2219.
- Fossati-Jimack, L., Reininger, L., Chicheportiche, Y., Clynes, R., Ravetch, J. V., Honjo, T., and Izui, S. (1999). High pathogenic potential of low-affinity autoantibodies in experimental autoimmune hemolytic anemia. *J Exp Med* *190*, 1689-1696.
- Fraser, J. K., Lin, F. K., and Berridge, M. V. (1988). Expression of high affinity receptors for erythropoietin on human bone marrow cells and on the human erythroleukemic cell line, HEL. *Exp Hematol* *16*, 836-842.
- Fraser, S. T., Isern, J., and Baron, M. H. (2007). Maturation and enucleation of primitive erythroblasts during mouse embryogenesis is accompanied by changes in cell-surface antigen expression. *Blood* *109*, 343-352.
- Fruman, D. A., Mauvais-Jarvis, F., Pollard, D. A., Yballe, C. M., Brazil, D., Bronson, R. T., Kahn, C. R., and Cantley, L. C. (2000). Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha. *Nat Genet* *26*, 379-382.
- Fujiwara, Y., Browne, C. P., Cunniff, K., Goff, S. C., and Orkin, S. H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 12355-12358.
- Galy, B., Ferring, D., Minana, B., Bell, O., Janser, H. G., Muckenthaler, M., Schumann, K., and Hentze, M. W. (2005). Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient in iron regulatory protein 2 (IRP2). *Blood* *106*, 2580-2589.
- Gao, J., Chen, J., Kramer, M., Tsukamoto, H., Zhang, A. S., and Enns, C. A. (2009). Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab* *9*, 217-227.
- Garcia, C. I., Paez, P., Soto, E. F., and Pasquini, J. M. (2003). Differential effects of apotransferrin on two populations of oligodendroglial cells. *Glia* *42*, 406-416.
- Garcon, L., Rivat, C., James, C., Lacout, C., Camara-Clayette, V., Ugo, V., Lecluse, Y., Bennaceur-Griscelli, A., and Vainchenker, W. (2006). Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood* *108*, 1551-1554.
- Geissler, E. N., Ryan, M. A., and Housman, D. E. (1988). The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* *55*, 185-192.

- Ghaffari, S., Kitidis, C., Zhao, W., Marinkovic, D., Fleming, M. D., Luo, B., Marszalek, J., and Lodish, H. F. (2006). AKT induces erythroid-cell maturation of JAK2-deficient fetal liver progenitor cells and is required for Epo regulation of erythroid-cell differentiation. *Blood* *107*, 1888-1891.
- Gilliland, D. G., and Griffin, J. D. (2002). The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* *100*, 1532-1542.
- Gillo, B., Ma, Y. S., and Marks, A. R. (1993). Calcium influx in induced differentiation of murine erythroleukemia cells. *Blood* *81*, 783-792.
- Gobert, S., Duprez, V., Lacombe, C., Gisselbrecht, S., and Mayeux, P. (1995). The signal transduction pathway of erythropoietin involves three forms of mitogen-activated protein (MAP) kinase in UT7 erythroleukemia cells. *Eur J Biochem* *234*, 75-83.
- Golab, J., Olszewska, D., Mroz, P., Kozar, K., Kaminski, R., Jalili, A., and Jakobisiak, M. (2002). Erythropoietin restores the antitumor effectiveness of photodynamic therapy in mice with chemotherapy-induced anemia. *Clin Cancer Res* *8*, 1265-1270.
- Gomme, P. T., McCann, K. B., and Bertolini, J. (2005). Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov Today* *10*, 267-273.
- Gommerman, J. L., Sittaro, D., Klebasz, N. Z., Williams, D. A., and Berger, S. A. (2000). Differential stimulation of c-Kit mutants by membrane-bound and soluble Steel Factor correlates with leukemic potential. *Blood* *96*, 3734-3742.
- Goswami, T., and Andrews, N. C. (2006). Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J Biol Chem* *281*, 28494-28498.
- Grebien, F., Kerenyi, M. A., Kovacic, B., Kolbe, T., Becker, V., Dolznig, H., Pfeffer, K., Klingmuller, U., Muller, M., Beug, H., *et al.* (2008). Stat5 activation enables erythropoiesis in the absence of EpoR and Jak2. *Blood* *111*, 4511-4522.
- Gregory, T., Yu, C., Ma, A., Orkin, S. H., Blobel, G. A., and Weiss, M. J. (1999). GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood* *94*, 87-96.
- Griffiss, J. M., and Goroff, D. K. (1983). IgA blocks IgM and IgG-initiated immune lysis by separate molecular mechanisms. *J Immunol* *130*, 2882-2885.
- Grillot, D. A., Gonzalez-Garcia, M., Ekhterae, D., Duan, L., Inohara, N., Ohta, S., Seldin, M. F., and Nunez, G. (1997). Genomic organization, promoter region analysis, and chromosome localization of the mouse bcl-x gene. *J Immunol* *158*, 4750-4757.
- Gubina, E., Rinaudo, M. S., Szallasi, Z., Blumberg, P. M., and Mufson, R. A. (1998). Overexpression of protein kinase C isoform epsilon but not delta in human interleukin-3-dependent cells suppresses apoptosis and induces bcl-2 expression. *Blood* *91*, 823-829.
- Guermazi, A., de Kerviler, E., Cazals-Hatem, D., Zagdanski, A. M., and Frija, J. (1999). Imaging findings in patients with myelofibrosis. *Eur Radiol* *9*, 1366-1375.

- Hafid-Medheb, K., Augery-Bourget, Y., Minatchy, M. N., Hanania, N., and Robert-Lezenes, J. (2003). Bcl-XL is required for heme synthesis during the chemical induction of erythroid differentiation of murine erythroleukemia cells independently of its antiapoptotic function. *Blood* *101*, 2575-2583.
- Haile, D. J., Rouault, T. A., Tang, C. K., Chin, J., Harford, J. B., and Klausner, R. D. (1992). Reciprocal control of RNA-binding and aconitase activity in the regulation of the iron-responsive element binding protein: role of the iron-sulfur cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 7536-7540.
- Halupa, A., Bailey, M. L., Huang, K., Iscove, N. N., Levy, D. E., and Barber, D. L. (2005). A novel role for STAT1 in regulating murine erythropoiesis: deletion of STAT1 results in overall reduction of erythroid progenitors and alters their distribution. *Blood* *105*, 552-561.
- Harashima, A., Suzuki, M., Okochi, A., Yamamoto, M., Matsuo, Y., Motoda, R., Yoshioka, T., and Orita, K. (2002). CD45 tyrosine phosphatase inhibits erythroid differentiation of umbilical cord blood CD34+ cells associated with selective inactivation of Lyn. *Blood* *100*, 4440-4445.
- Haseyama, Y., Sawada, K., Oda, A., Koizumi, K., Takano, H., Tarumi, T., Nishio, M., Handa, M., Ikeda, Y., and Koike, T. (1999). Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the protection of primary cultured human erythroid precursor cells from apoptosis. *Blood* *94*, 1568-1577.
- Hayashi, A., Wada, Y., Suzuki, T., and Shimizu, A. (1993). Studies on familial hypotransferrinemia: unique clinical course and molecular pathology. *Am J Hum Genet* *53*, 201-213.
- Heinrich, M. C., Blanke, C. D., Druker, B. J., and Corless, C. L. (2002). Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol* *20*, 1692-1703.
- Henke, M., Mattern, D., Pepe, M., Bezay, C., Weissenberger, C., Werner, M., and Pajonk, F. (2006). Do erythropoietin receptors on cancer cells explain unexpected clinical findings? *J Clin Oncol* *24*, 4708-4713.
- Herbert, K. E., Morgan, S., Prince, H. M., Westerman, D. A., Wolf, M. M., Carney, D. A., Yuen, K., di Iulio, J., and Seymour, J. F. (2009). Stem cell factor and high-dose twice daily filgrastim is an effective strategy for peripheral blood stem cell mobilization in patients with indolent lymphoproliferative disorders previously treated with fludarabine: results of a Phase II study with an historical comparator. *Leukemia* *23*, 305-312.
- Hernandez-Hernandez, A., Ray, P., Litos, G., Ciro, M., Ottolenghi, S., Beug, H., and Boyes, J. (2006). Acetylation and MAPK phosphorylation cooperate to regulate the degradation of active GATA-1. *Embo J* *25*, 3264-3274.
- Hirschler-Laszkiewicz, I., Tong, Q., Conrad, K., Zhang, W., Flint, W. W., Barber, A. J., Barber, D. L., Cheung, J. Y., and Miller, B. A. (2009). TRPC3 activation by erythropoietin is modulated by TRPC6. *J Biol Chem* *284*, 4567-4581.
- Holmstrom, P., Dzikaite, V., Hultcrantz, R., Melefors, O., Eckes, K., Stal, P., Kinnman, N., Smedsrod, B., Gafvels, M., and Eggertsen, G. (2003). Structure and liver cell expression pattern of the HFE gene in the rat. *J Hepatol* *39*, 308-314.
- Hong, L., Ramdas, B., Chen, J., Harris, C., Wojchowski, D. M., and Kapur, R. (2008). KIT associated intracellular tyrosines play an essential role in EpoR co-signaling. *Cell Signal* *20*, 1513-1520.

- Huang, E., Nocka, K., Beier, D. R., Chu, T. Y., Buck, J., Lahm, H. W., Wellner, D., Leder, P., and Besmer, P. (1990). The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell* *63*, 225-233.
- Huber, M., Helgason, C. D., Damen, J. E., Liu, L., Humphries, R. K., and Krystal, G. (1998). The src homology 2-containing inositol phosphatase (SHIP) is the gatekeeper of mast cell degranulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 11330-11335.
- Huddlestone, H., Tan, B., Yang, F. C., White, H., Wenning, M. J., Orazi, A., Yoder, M. C., Kapur, R., and Ingram, D. A. (2003). Functional p85alpha gene is required for normal murine fetal erythropoiesis. *Blood* *102*, 142-145.
- Idzerda, R. L., Huebers, H., Finch, C. A., and McKnight, G. S. (1986). Rat transferrin gene expression: tissue-specific regulation by iron deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* *83*, 3723-3727.
- Ingle, E., McCarthy, D. J., Pore, J. R., Sarna, M. K., Adenan, A. S., Wright, M. J., Erber, W., Tilbrook, P. A., and Klinken, S. P. (2005). Lyn deficiency reduces GATA-1, EKLf and STAT5, and induces extramedullary stress erythropoiesis. *Oncogene* *24*, 336-343.
- Ishibashi, T., Koziol, J. A., and Burstein, S. A. (1987). Human recombinant erythropoietin promotes differentiation of murine megakaryocytes in vitro. *J Clin Invest* *79*, 286-289.
- Islam, K. B., Baskin, B., Nilsson, L., Hammarstrom, L., Sideras, P., and Smith, C. I. (1994). Molecular analysis of IgA deficiency. Evidence for impaired switching to IgA. *J Immunol* *152*, 1442-1452.
- Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y., and Semenza, G. L. (1998). Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* *12*, 149-162.
- Jacobs-Helber, S. M., Penta, K., Sun, Z., Lawson, A., and Sawyer, S. T. (1997). Distinct signaling from stem cell factor and erythropoietin in HCD57 cells. *J Biol Chem* *272*, 6850-6853.
- Jacobs-Helber, S. M., and Sawyer, S. T. (2004). Jun N-terminal kinase promotes proliferation of immature erythroid cells and erythropoietin-dependent cell lines. *Blood* *104*, 696-703.
- James, C., Ugo, V., Le Couedic, J. P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garcon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., *et al.* (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* *434*, 1144-1148.
- Johansen, F. E., Braathen, R., and Brandtzaeg, P. (2000). Role of J chain in secretory immunoglobulin formation. *Scand J Immunol* *52*, 240-248.
- Johansen, F. E., Braathen, R., and Brandtzaeg, P. (2001). The J chain is essential for polymeric Ig receptor-mediated epithelial transport of IgA. *J Immunol* *167*, 5185-5192.
- Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, R. T., Umanoff, H., Edelmann, W., Kucherlapati, R., and Jacks, T. (1997). K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev* *11*, 2468-2481.

- Johnson, M. B., and Enns, C. A. (2004). Diferric transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability. *Blood* 104, 4287-4293.
- Johnstone, R. M. (2006). Exosomes biological significance: A concise review. *Blood Cells Mol Dis* 36, 315-321.
- Juul, S. (2004). Recombinant erythropoietin as a neuroprotective treatment: in vitro and in vivo models. *Clin Perinatol* 31, 129-142.
- Kang, C. J., Sheridan, C., and Koshland, M. E. (1998). A stage-specific enhancer of immunoglobulin J chain gene is induced by interleukin-2 in a presecretor B cell stage. *Immunity* 8, 285-295.
- Kapur, R., and Zhang, L. (2001). A novel mechanism of cooperation between c-Kit and erythropoietin receptor. Stem cell factor induces the expression of Stat5 and erythropoietin receptor, resulting in efficient proliferation and survival by erythropoietin. *J Biol Chem* 276, 1099-1106.
- Karur, V. G., Lowell, C. A., Besmer, P., Agosti, V., and Wojchowski, D. M. (2006). Lyn kinase promotes erythroblast expansion and late-stage development. *Blood* 108, 1524-1532.
- Kashii, Y., Uchida, M., Kirito, K., Tanaka, M., Nishijima, K., Toshima, M., Ando, T., Koizumi, K., Endoh, T., Sawada, K., *et al.* (2000). A member of Forkhead family transcription factor, FKHL1, is one of the downstream molecules of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction. *Blood* 96, 941-949.
- Katayama, N., Shih, J. P., Nishikawa, S., Kina, T., Clark, S. C., and Ogawa, M. (1993). Stage-specific expression of c-kit protein by murine hematopoietic progenitors. *Blood* 82, 2353-2360.
- Kautz, L., Meynard, D., Besson-Fournier, C., Darnaud, V., Al Saati, T., Coppin, H., and Roth, M. P. (2009). BMP/Smad signaling is not enhanced in Hfe-deficient mice despite increased Bmp6 expression. *Blood* 114, 2515-2520.
- Kawabata, H., Germain, R. S., Ikezoe, T., Tong, X., Green, E. M., Gombart, A. F., and Koeffler, H. P. (2001a). Regulation of expression of murine transferrin receptor 2. *Blood* 98, 1949-1954.
- Kawabata, H., Germain, R. S., Vuong, P. T., Nakamaki, T., Said, J. W., and Koeffler, H. P. (2000). Transferrin receptor 2-alpha supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo. *J Biol Chem* 275, 16618-16625.
- Kawabata, H., Nakamaki, T., Ikonomi, P., Smith, R. D., Germain, R. S., and Koeffler, H. P. (2001b). Expression of transferrin receptor 2 in normal and neoplastic hematopoietic cells. *Blood* 98, 2714-2719.
- Kawabata, H., Yang, R., Hiramata, T., Vuong, P. T., Kawano, S., Gombart, A. F., and Koeffler, H. P. (1999). Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem* 274, 20826-20832.
- Keel, S. B., Doty, R. T., Yang, Z., Quigley, J. G., Chen, J., Knoblauch, S., Kingsley, P. D., De Domenico, I., Vaughn, M. B., Kaplan, J., *et al.* (2008). A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science* 319, 825-828.

- Kelley, L. L., Koury, M. J., Bondurant, M. C., Koury, S. T., Sawyer, S. T., and Wickrema, A. (1993). Survival or death of individual proerythroblasts results from differing erythropoietin sensitivities: a mechanism for controlled rates of erythrocyte production. *Blood* *82*, 2340-2352.
- Kerenyi, M. A., Grebien, F., Gehart, H., Schifrer, M., Artaker, M., Kovacic, B., Beug, H., Moriggl, R., and Mullner, E. W. (2008). Stat5 regulates cellular iron uptake of erythroid cells via IRP-2 and TfR-1. *Blood* *112*, 3878-3888.
- Kerr, M. A. (1990). The structure and function of human IgA. *Biochem J* *271*, 285-296.
- Khalaf, W. F., White, H., Wenning, M. J., Orazi, A., Kapur, R., and Ingram, D. A. (2005). K-Ras is essential for normal fetal liver erythropoiesis. *Blood* *105*, 3538-3541.
- Khan, W. N., Alt, F. W., Gerstein, R. M., Malynn, B. A., Larsson, I., Rathbun, G., Davidson, L., Muller, S., Kantor, A. B., Herzenberg, L. A., and et al. (1995). Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity* *3*, 283-299.
- Kim, S., and Ponka, P. (1999). Control of transferrin receptor expression via nitric oxide-mediated modulation of iron-regulatory protein 2. *J Biol Chem* *274*, 33035-33042.
- Kingsley, P. D., Malik, J., Fantauzzo, K. A., and Palis, J. (2004). Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. *Blood* *104*, 19-25.
- Kirito, K., Nakajima, K., Watanabe, T., Uchida, M., Tanaka, M., Ozawa, K., and Komatsu, N. (2002). Identification of the human erythropoietin receptor region required for Stat1 and Stat3 activation. *Blood* *99*, 102-110.
- Kirito, K., Uchida, M., Yamada, M., Miura, Y., and Komatsu, N. (1997). A distinct function of STAT proteins in erythropoietin signal transduction. *J Biol Chem* *272*, 16507-16513.
- Kitanaka, A., Waki, M., Kamano, H., Tanaka, T., Kubota, Y., Ohnishi, H., Takahara, J., and Irino, S. (1994). Antisense src expression inhibits proliferation and erythropoietin-induced erythroid differentiation of K562 human leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* *201*, 1534-1540.
- Klausner, R. D., Ashwell, G., van Renswoude, J., Harford, J. B., and Bridges, K. R. (1983). Binding of apotransferrin to K562 cells: explanation of the transferrin cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* *80*, 2263-2266.
- Klausner, R. D., Harford, J., and van Renswoude, J. (1984). Rapid internalization of the transferrin receptor in K562 cells is triggered by ligand binding or treatment with a phorbol ester. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 3005-3009.
- Knight, K. L., and Hanly, W. C. (1975). Genetic control of alpha chains of rabbit IgA: allotypic specificities on the variable and the constant regions. *Contemp Top Mol Immunol* *4*, 55-88.
- Knutson, M., and Wessling-Resnick, M. (2003). Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit Rev Biochem Mol Biol* *38*, 61-88.
- Koera, K., Nakamura, K., Nakao, K., Miyoshi, J., Toyoshima, K., Hatta, T., Otani, H., Aiba, A., and Katsuki, M. (1997). K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene* *15*, 1151-1159.

- Koshland, M. E. (1983). Presidential address: molecular aspects of B cell differentiation. American Association of Immunologists April 1983. *J Immunol* *131*, i-ix.
- Koshland, M. E. (1985). The coming of age of the immunoglobulin J chain. *Annu Rev Immunol* *3*, 425-453.
- Kosmider, O., Buet, D., Gallais, I., Denis, N., and Moreau-Gachelin, F. (2009). Erythropoietin down-regulates stem cell factor receptor (Kit) expression in the leukemic proerythroblast: role of Lyn kinase. *PLoS One* *4*, e5721.
- Kosmider, O., Denis, N., Lacout, C., Vainchenker, W., Dubreuil, P., and Moreau-Gachelin, F. (2005). Kit-activating mutations cooperate with Spi-1/PU.1 overexpression to promote tumorigenic progression during erythroleukemia in mice. *Cancer Cell* *8*, 467-478.
- Koury, M. J., and Bondurant, M. C. (1990). Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* *248*, 378-381.
- Koury, S. T., Koury, M. J., Bondurant, M. C., Caro, J., and Graber, S. E. (1989). Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. *Blood* *74*, 645-651.
- Krantz, S. B. (1991). Erythropoietin. *Blood* *77*, 419-434.
- Krugmann, S., Pleass, R. J., Atkin, J. D., and Woof, J. M. (1997). Structural requirements for assembly of dimeric IgA probed by site-directed mutagenesis of J chain and a cysteine residue of the alpha-chain CH2 domain. *J Immunol* *159*, 244-249.
- Kubatzky, K. F., Ruan, W., Gurezka, R., Cohen, J., Ketteler, R., Watowich, S. S., Neumann, D., Langosch, D., and Klingmuller, U. (2001). Self assembly of the transmembrane domain promotes signal transduction through the erythropoietin receptor. *Curr Biol* *11*, 110-115.
- Kubota, Y., Tanaka, T., Kitanaka, A., Ohnishi, H., Okutani, Y., Waki, M., Ishida, T., and Kamano, H. (2001). Src transduces erythropoietin-induced differentiation signals through phosphatidylinositol 3-kinase. *Embo J* *20*, 5666-5677.
- Kutteh, W. H., Prince, S. J., and Mestecky, J. (1982). Tissue origins of human polymeric and monomeric IgA. *J Immunol* *128*, 990-995.
- Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M. L., and Bruick, R. K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* *16*, 1466-1471.
- Landschulz, K. T., Boyer, S. H., Noyes, A. N., Rogers, O. C., and Frelin, L. P. (1992). Onset of erythropoietin response in murine erythroid colony-forming units: assignment to early S-phase in a specific cell generation. *Blood* *79*, 2749-2758.
- Langley, K. E., Bennett, L. G., Wypych, J., Yancik, S. A., Liu, X. D., Westcott, K. R., Chang, D. G., Smith, K. A., and Zsebo, K. M. (1993). Soluble stem cell factor in human serum. *Blood* *81*, 656-660.
- Lansford, R. D., McFadden, H. J., Siu, S. T., Cox, J. S., Cann, G. M., and Koshland, M. E. (1992). A promoter element that exerts positive and negative control of the interleukin 2-responsive J-chain gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 5966-5970.

- Lawrence, C. M., Ray, S., Babyonyshev, M., Galluser, R., Borhani, D. W., and Harrison, S. C. (1999). Crystal structure of the ectodomain of human transferrin receptor. *Science* *286*, 779-782.
- Lebron, J. A., Bennett, M. J., Vaughn, D. E., Chirino, A. J., Snow, P. M., Mintier, G. A., Feder, J. N., and Bjorkman, P. J. (1998). Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* *93*, 111-123.
- Lebron, J. A., and Bjorkman, P. J. (1999). The transferrin receptor binding site on HFE, the class I MHC-related protein mutated in hereditary hemochromatosis. *J Mol Biol* *289*, 1109-1118.
- Lee, J. W., Gersuk, G. M., Kiener, P. A., Beckham, C., Ledbetter, J. A., and Deeg, H. J. (1997). HLA-DR-triggered inhibition of hemopoiesis involves Fas/Fas ligand interactions and is prevented by c-kit ligand. *J Immunol* *159*, 3211-3219.
- Lenox, L. E., Perry, J. M., and Paulson, R. F. (2005). BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia. *Blood* *105*, 2741-2748.
- Lepelletier, Y., Camara-Clayette, V., Jin, H., Hermant, A., Coulon, S., Dussiot, M., Arcos-Fajardo, M., Baude, C., Canionni, D., Delarue, R., *et al.* (2007). Prevention of mantle lymphoma tumor establishment by routing transferrin receptor toward lysosomal compartments. *Cancer Res* *67*, 1145-1154.
- Lesley, J., Hyman, R., Schulte, R., and Trotter, J. (1984). Expression of transferrin receptor on murine hematopoietic progenitors. *Cell Immunol* *83*, 14-25.
- Letting, D. L., Chen, Y. Y., Rakowski, C., Reedy, S., and Blobel, G. A. (2004). Context-dependent regulation of GATA-1 by friend of GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 476-481.
- Leung, C. G., Xu, Y., Mularski, B., Liu, H., Gurbuxani, S., and Crispino, J. D. (2007). Requirements for survivin in terminal differentiation of erythroid cells and maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells. *J Exp Med* *204*, 1603-1611.
- Leungwattanakij, S., Bivalacqua, T. J., Usta, M. F., Yang, D. Y., Hyun, J. S., Champion, H. C., Abdel-Mageed, A. B., and Hellstrom, W. J. (2003). Cavernous neurotomy causes hypoxia and fibrosis in rat corpus cavernosum. *J Androl* *24*, 239-245.
- Levesque, J. P., Leavesley, D. I., Niutta, S., Vadas, M., and Simmons, P. J. (1995). Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins. *J Exp Med* *181*, 1805-1815.
- Levy, J. E., Jin, O., Fujiwara, Y., Kuo, F., and Andrews, N. C. (1999). Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat Genet* *21*, 396-399.
- Leyland-Jones, B., Semiglazov, V., Pawlicki, M., Pienkowski, T., Tjulandin, S., Manikhas, G., Makhson, A., Roth, A., Dodwell, D., Baselga, J., *et al.* (2005). Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study. *J Clin Oncol* *23*, 5960-5972.
- Li, K., Menon, M. P., Karur, V. G., Hegde, S., and Wojchowski, D. M. (2003a). Attenuated signaling by a phosphotyrosine-null Epo receptor form in primary erythroid progenitor cells. *Blood* *102*, 3147-3153.

- Li, K., Miller, C., Hegde, S., and Wojchowski, D. (2003b). Roles for an Epo receptor Tyr-343 Stat5 pathway in proliferative co-signaling with kit. *J Biol Chem* 278, 40702-40709.
- Lim, J. H., Kim, H. G., Park, S. K., and Kang, C. J. (2009). The promoter of the Immunoglobulin J Chain gene receives its authentic enhancer activity through the abutting MEF2 and PU.1 sites in a DNA-looping interaction. *J Mol Biol* 390, 339-352.
- Lin, Y. C., Shockett, P., and Stavnezer, J. (1991). Regulation of the antibody class switch to IgA. *Immunol Res* 10, 376-380.
- Lindauer, K., Loerting, T., Liedl, K. R., and Kroemer, R. T. (2001). Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising the two carboxy-terminal domains reveals a mechanism for autoregulation. *Protein Eng* 14, 27-37.
- Linnekin, D., DeBerry, C. S., and Mou, S. (1997). Lyn associates with the juxtamembrane region of c-Kit and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells. *J Biol Chem* 272, 27450-27455.
- Litchfield, D. W. (2003). Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* 369, 1-15.
- Liu, Y., Pop, R., Sadegh, C., Brugnara, C., Haase, V. H., and Socolovsky, M. (2006). Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood* 108, 123-133.
- Livnah, O., Stura, E. A., Johnson, D. L., Middleton, S. A., Mulcahy, L. S., Wrighton, N. C., Dower, W. J., Jolliffe, L. K., and Wilson, I. A. (1996). Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: the EPO receptor complex at 2.8 Å. *Science* 273, 464-471.
- Lok, C. N., and Ponka, P. (1999). Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem* 274, 24147-24152.
- Longmore, G. D., and Lodish, H. F. (1991). An activating mutation in the murine erythropoietin receptor induces erythroleukemia in mice: a cytokine receptor superfamily oncogene. *Cell* 67, 1089-1102.
- Lux, C. T., Yoshimoto, M., McGrath, K., Conway, S. J., Palis, J., and Yoder, M. C. (2008). All primitive and definitive hematopoietic progenitor cells emerging before E10 in the mouse embryo are products of the yolk sac. *Blood* 111, 3435-3438.
- Macdougall, I. C., Tucker, B., Thompson, J., Tomson, C. R., Baker, L. R., and Raine, A. E. (1996). A randomized controlled study of iron supplementation in patients treated with erythropoietin. *Kidney Int* 50, 1694-1699.
- Mackay, H. J., and Twelves, C. J. (2007). Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat Rev Cancer* 7, 554-562.
- Malgor, L. A., Valsecia, M., Verges, E., and De Markowsky, E. E. (1998). Blockade of the in vitro effects of testosterone and erythropoietin on Cfu-E and Bfu-E proliferation by pretreatment of the donor rats with cyproterone and flutamide. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 48, 99-105.

- Manger, B., Weiss, A., Hardy, K. J., and Stobo, J. D. (1986). A transferrin receptor antibody represents one signal for the induction of IL 2 production by a human T cell line. *J Immunol* *136*, 532-538.
- Marshall, C. J. (1996). Cell signalling. Raf gets it together. *Nature* *383*, 127-128.
- Martin, D. I., and Orkin, S. H. (1990). Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes Dev* *4*, 1886-1898.
- Masuda, S., Nagao, M., and Sasaki, R. (1999). Erythropoietic, neurotrophic, and angiogenic functions of erythropoietin and regulation of erythropoietin production. *Int J Hematol* *70*, 1-6.
- Mattu, T. S., Pleass, R. J., Willis, A. C., Kilian, M., Wormald, M. R., Lellouch, A. C., Rudd, P. M., Woof, J. M., and Dwek, R. A. (1998). The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc alpha receptor interactions. *J Biol Chem* *273*, 2260-2272.
- Matysiak-Budnik, T., Moura, I. C., Arcos-Fajardo, M., Lebreton, C., Menard, S., Candalh, C., Ben-Khalifa, K., Dugave, C., Tamouza, H., van Niel, G., *et al.* (2008). Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med* *205*, 143-154.
- Maxwell, P. H., Ferguson, D. J., Osmond, M. K., Pugh, C. W., Heryet, A., Doe, B. G., Johnson, M. H., and Ratcliffe, P. J. (1994). Expression of a homologously recombined erythropoietin-SV40 T antigen fusion gene in mouse liver: evidence for erythropoietin production by Ito cells. *Blood* *84*, 1823-1830.
- Maxwell, P. H., Osmond, M. K., Pugh, C. W., Heryet, A., Nicholls, L. G., Tan, C. C., Doe, B. G., Ferguson, D. J., Johnson, M. H., and Ratcliffe, P. J. (1993). Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int* *44*, 1149-1162.
- May, W. S., Jacobs, S., and Cuatrecasas, P. (1984). Association of phorbol ester-induced hyperphosphorylation and reversible regulation of transferrin membrane receptors in HL60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 2016-2020.
- McCulloch, E. A., Siminovitch, L., and Till, J. E. (1964). Spleen-Colony Formation in Anemic Mice of Genotype Ww. *Science* *144*, 844-846.
- McDevitt, M. A., Shivdasani, R. A., Fujiwara, Y., Yang, H., and Orkin, S. H. (1997). A "knockdown" mutation created by cis-element gene targeting reveals the dependence of erythroid cell maturation on the level of transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 6781-6785.
- McDonald, T. P., and Sullivan, P. S. (1993). Megakaryocytic and erythrocytic cell lines share a common precursor cell. *Exp Hematol* *21*, 1316-1320.
- McGrath, K. E., Kingsley, P. D., Koniski, A. D., Porter, R. L., Bushnell, T. P., and Palis, J. (2008). Eucleation of primitive erythroid cells generates a transient population of "pyrenocytes" in the mammalian fetus. *Blood* *111*, 2409-2417.
- McNiece, I. K., and Briddell, R. A. (1995). Stem cell factor. *J Leukoc Biol* *58*, 14-22.

- Medvinsky, A., and Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86, 897-906.
- Meehan, R., Duncan, U., Neale, L., Taylor, G., Muchmore, H., Scott, N., Ramsey, K., Smith, E., Rock, P., Goldblum, R., and et al. (1988). Operation Everest II: alterations in the immune system at high altitudes. *J Clin Immunol* 8, 397-406.
- Mestecky, J., Kutteh, W. H., Brown, T. A., Russell, M. W., Phillips, J. O., Moldoveanu, Z., Moro, I., and Crago, S. S. (1983). Function and biosynthesis of polymeric IgA. *Ann N Y Acad Sci* 409, 292-306.
- Mestecky, J., and Russell, M. W. (1997). Mucosal immunoglobulins and their contribution to defence mechanisms: an overview. *Biochem Soc Trans* 25, 457-462.
- Meyron-Holtz, E. G., Ghosh, M. C., and Rouault, T. A. (2004). Mammalian tissue oxygen levels modulate iron-regulatory protein activities in vivo. *Science* 306, 2087-2090.
- Migliaccio, A. R., and Migliaccio, G. (1988). Human embryonic hemopoiesis: control mechanisms underlying progenitor differentiation in vitro. *Dev Biol* 125, 127-134.
- Mignotte, V., Eleouet, J. F., Raich, N., and Romeo, P. H. (1989). Cis- and trans-acting elements involved in the regulation of the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6548-6552.
- Mikkola, H. K., Gekas, C., Orkin, S. H., and Dieterlen-Lievre, F. (2005). Placenta as a site for hematopoietic stem cell development. *Exp Hematol* 33, 1048-1054.
- Miller, B. A., Barber, D. L., Bell, L. L., Beattie, B. K., Zhang, M. Y., Neel, B. G., Yoakim, M., Rothblum, L. I., and Cheung, J. Y. (1999). Identification of the erythropoietin receptor domain required for calcium channel activation. *J Biol Chem* 274, 20465-20472.
- Miller, B. A., Cheung, J. Y., Tillotson, D. L., Hope, S. M., and Scaduto, R. C., Jr. (1989). Erythropoietin stimulates a rise in intracellular-free calcium concentration in single BFU-E derived erythroblasts at specific stages of differentiation. *Blood* 73, 1188-1194.
- Miller, C. P., Heilman, D. W., and Wojchowski, D. M. (2002). Erythropoietin receptor-dependent erythroid colony-forming unit development: capacities of Y343 and phosphotyrosine-null receptor forms. *Blood* 99, 898-904.
- Mirandola, P., Gobbi, G., Ponti, C., Sponzilli, I., Cocco, L., and Vitale, M. (2006). PKCepsilon controls protection against TRAIL in erythroid progenitors. *Blood* 107, 508-513.
- Miura, O., D'Andrea, A., Kabat, D., and Ihle, J. N. (1991). Induction of tyrosine phosphorylation by the erythropoietin receptor correlates with mitogenesis. *Mol Cell Biol* 11, 4895-4902.
- Miyake, T., Kung, C. K., and Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 252, 5558-5564.
- Miyazawa, K., Williams, D. A., Gotoh, A., Nishimaki, J., Broxmeyer, H. E., and Toyama, K. (1995). Membrane-bound Steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encoded protein than its soluble form. *Blood* 85, 641-649.

- Moldoveanu, Z., Moro, I., Radl, J., Thorpe, S. R., Komiyama, K., and Mestecky, J. (1990). Site of catabolism of autologous and heterologous IgA in non-human primates. *Scand J Immunol* *32*, 577-583.
- Monteiro, R. C., Cooper, M. D., and Kubagawa, H. (1992). Molecular heterogeneity of Fc alpha receptors detected by receptor-specific monoclonal antibodies. *J Immunol* *148*, 1764-1770.
- Monteiro, R. C., and Van De Winkel, J. G. (2003). IgA Fc receptors. *Annu Rev Immunol* *21*, 177-204.
- Moore, K. A. (2004). Recent advances in defining the hematopoietic stem cell niche. *Curr Opin Hematol* *11*, 107-111.
- Moreau-Gachelin, F., Tavitian, A., and Tambourin, P. (1988). Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature* *331*, 277-280.
- Moriggl, R., Sexl, V., Kenner, L., Duntsch, C., Stangl, K., Gingras, S., Hoffmeyer, A., Bauer, A., Piekorz, R., Wang, D., *et al.* (2005). Stat5 tetramer formation is associated with leukemogenesis. *Cancer Cell* *7*, 87-99.
- Morton, H. C., Atkin, J. D., Owens, R. J., and Woof, J. M. (1993). Purification and characterization of chimeric human IgA1 and IgA2 expressed in COS and Chinese hamster ovary cells. *J Immunol* *151*, 4743-4752.
- Motoyama, N., Kimura, T., Takahashi, T., Watanabe, T., and Nakano, T. (1999). bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *J Exp Med* *189*, 1691-1698.
- Motoyama, N., Wang, F., Roth, K. A., Sawa, H., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S., and *et al.* (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* *267*, 1506-1510.
- Moura, I. C., Arcos-Fajardo, M., Gdoura, A., Leroy, V., Sadaka, C., Mahlaoui, N., Lepelletier, Y., Vrtovsnik, F., Haddad, E., Benhamou, M., and Monteiro, R. C. (2005). Engagement of transferrin receptor by polymeric IgA1: evidence for a positive feedback loop involving increased receptor expression and mesangial cell proliferation in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* *16*, 2667-2676.
- Moura, I. C., Arcos-Fajardo, M., Sadaka, C., Leroy, V., Benhamou, M., Novak, J., Vrtovsnik, F., Haddad, E., Chintalacheruvu, K. R., and Monteiro, R. C. (2004a). Glycosylation and size of IgA1 are essential for interaction with mesangial transferrin receptor in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* *15*, 622-634.
- Moura, I. C., Centelles, M. N., Arcos-Fajardo, M., Malheiros, D. M., Collawn, J. F., Cooper, M. D., and Monteiro, R. C. (2001). Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. *J Exp Med* *194*, 417-425.
- Moura, I. C., Lepelletier, Y., Arnulf, B., England, P., Baude, C., Beaumont, C., Bazarbachi, A., Benhamou, M., Monteiro, R. C., and Hermine, O. (2004b). A neutralizing monoclonal antibody (mAb A24) directed against the transferrin receptor induces apoptosis of tumor T lymphocytes from ATL patients. *Blood* *103*, 1838-1845.
- Mulks, M. H., and Shoberg, R. J. (1994). Bacterial immunoglobulin A1 proteases. *Methods Enzymol* *235*, 543-554.

- Munugalavadla, V., Dore, L. C., Tan, B. L., Hong, L., Vishnu, M., Weiss, M. J., and Kapur, R. (2005). Repression of c-kit and its downstream substrates by GATA-1 inhibits cell proliferation during erythroid maturation. *Mol Cell Biol* 25, 6747-6759.
- Muta, K., Krantz, S. B., Bondurant, M. C., and Dai, C. H. (1995). Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. *Blood* 86, 572-580.
- Myklebust, J. H., Blomhoff, H. K., Rusten, L. S., Stokke, T., and Smeland, E. B. (2002). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 30, 990-1000.
- Nagata, Y., Takahashi, N., Davis, R. J., and Todokoro, K. (1998). Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood* 92, 1859-1869.
- Nakamura, Y., Komatsu, N., and Nakauchi, H. (1992). A truncated erythropoietin receptor that fails to prevent programmed cell death of erythroid cells. *Science* 257, 1138-1141.
- Navas, T. A., Mohindru, M., Estes, M., Ma, J. Y., Sokol, L., Pahanish, P., Parmar, S., Haghazari, E., Zhou, L., Collins, R., *et al.* (2006). Inhibition of overactivated p38 MAPK can restore hematopoiesis in myelodysplastic syndrome progenitors. *Blood* 108, 4170-4177.
- Ned, R. M., Swat, W., and Andrews, N. C. (2003). Transferrin receptor 1 is differentially required in lymphocyte development. *Blood* 102, 3711-3718.
- Neubauer, H., Cumano, A., Muller, M., Wu, H., Huffstadt, U., and Pfeffer, K. (1998). Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 93, 397-409.
- Nicholson, K. M., and Anderson, N. G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14, 381-395.
- Niles, M. J., Matsuuchi, L., and Koshland, M. E. (1995). Polymer IgM assembly and secretion in lymphoid and nonlymphoid cell lines: evidence that J chain is required for pentamer IgM synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2884-2888.
- Nishimura, S., Takahashi, S., Kuroha, T., Suwabe, N., Nagasawa, T., Trainor, C., and Yamamoto, M. (2000). A GATA box in the GATA-1 gene hematopoietic enhancer is a critical element in the network of GATA factors and sites that regulate this gene. *Mol Cell Biol* 20, 713-723.
- Nishio, M., Oda, A., Koizumi, K., Satoh, I., Sato, Y., Endoh, T., Tsutsumi, A., Fujihara, M., Ikebuchi, K., Ikeda, H., *et al.* (2001). Stem cell factor prevents Fas-mediated apoptosis of human erythroid precursor cells with Src-family kinase dependency. *Exp Hematol* 29, 19-29.
- Norman, J. T., Clark, I. M., and Garcia, P. L. (2000). Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts. *Kidney Int* 58, 2351-2366.
- Novak, J., Julian, B. A., Tomana, M., and Mestecky, J. (2008). IgA glycosylation and IgA immune complexes in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Semin Nephrol* 28, 78-87.
- Novak, J., Moldoveanu, Z., Renfrow, M. B., Yanagihara, T., Suzuki, H., Raska, M., Hall, S., Brown, R., Huang, W. Q., Goepfert, A., *et al.* (2007). IgA nephropathy and Henoch-Schoenlein purpura nephritis:

aberrant glycosylation of IgA1, formation of IgA1-containing immune complexes, and activation of mesangial cells. *Contrib Nephrol* 157, 134-138.

Ohgami, R. S., Campagna, D. R., Greer, E. L., Antiochos, B., McDonald, A., Chen, J., Sharp, J. J., Fujiwara, Y., Barker, J. E., and Fleming, M. D. (2005). Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet* 37, 1264-1269.

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

Okutani, Y., Kitanaka, A., Tanaka, T., Kamano, H., Ohnishi, H., Kubota, Y., Ishida, T., and Takahara, J. (2001). Src directly tyrosine-phosphorylates STAT5 on its activation site and is involved in erythropoietin-induced signaling pathway. *Oncogene* 20, 6643-6650.

Oldstone, M. B. (2002). Arenaviruses. II. The molecular pathogenesis of arenavirus infections. Introduction. *Curr Top Microbiol Immunol* 263, V-XII.

Ozaki, S., Nagasawa, R., Sato, H., and Shirai, T. (1984). Hybridoma autoantibodies to erythrocytes from NZB mice and the induction of hemolytic anemia. *Immunol Lett* 8, 115-119.

Pace, B. S., Qian, X. H., Sangerman, J., Ofori-Acquah, S. F., Baliga, B. S., Han, J., and Critz, S. D. (2003). p38 MAP kinase activation mediates gamma-globin gene induction in erythroid progenitors. *Exp Hematol* 31, 1089-1096.

Palis, J. (2008). Ontogeny of erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 15, 155-161.

Pan, B. T., and Johnstone, R. M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 33, 967-978.

Pan, B. T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., and Johnstone, R. M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 101, 942-948.

Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D. J., Marine, J. C., Teglund, S., Vanin, E. F., Bodner, S., Colamonici, O. R., van Deursen, J. M., *et al.* (1998). Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 93, 385-395.

Parkkila, S., Waheed, A., Britton, R. S., Bacon, B. R., Zhou, X. Y., Tomatsu, S., Fleming, R. E., and Sly, W. S. (1997). Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13198-13202.

Partovian, C., and Simons, M. (2004). Regulation of protein kinase B/Akt activity and Ser473 phosphorylation by protein kinase Calpha in endothelial cells. *Cell Signal* 16, 951-957.

Pasquier, B., Launay, P., Kanamaru, Y., Moura, I. C., Pfirsch, S., Ruffie, C., Henin, D., Benhamou, M., Pretolani, M., Blank, U., and Monteiro, R. C. (2005). Identification of FcalphaRI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcRgamma ITAM. *Immunity* 22, 31-42.

Perry, J. M., Harandi, O. F., and Paulson, R. F. (2007). BMP4, SCF, and hypoxia cooperatively regulate the expansion of murine stress erythroid progenitors. *Blood* 109, 4494-4502.

- Peters, C. J., and Zaki, S. R. (2002). Role of the endothelium in viral hemorrhagic fevers. *Crit Care Med* 30, S268-273.
- Peyssonnaud, C., Nizet, V., and Johnson, R. S. (2008). Role of the hypoxia inducible factors HIF in iron metabolism. *Cell Cycle* 7, 28-32.
- Phillips-Quagliata, J. M. (2002). Mouse IgA allotypes have major differences in their hinge regions. *Immunogenetics* 53, 1033-1038.
- Pointon, J. J., Wallace, D., Merryweather-Clarke, A. T., and Robson, K. J. (2000). Uncommon mutations and polymorphisms in the hemochromatosis gene. *Genet Test* 4, 151-161.
- Ponka, P., and Lok, C. N. (1999). The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 1111-1137.
- Quigley, J. G., Yang, Z., Worthington, M. T., Phillips, J. D., Sabo, K. M., Sabath, D. E., Berg, C. L., Sassa, S., Wood, B. L., and Abkowitz, J. L. (2004). Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell* 118, 757-766.
- Radoshitzky, S. R., Abraham, J., Spiropoulou, C. F., Kuhn, J. H., Nguyen, D., Li, W., Nagel, J., Schmidt, P. J., Nunberg, J. H., Andrews, N. C., *et al.* (2007). Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature* 446, 92-96.
- Reissmann, K. R. (1950). Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. *Blood* 5, 372-380.
- Ribeil, J. A., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Cathelin, S., Kersual, J., Dussiot, M., Coulon, S., Moura, I. C., Zeuner, A., Kirkegaard-Sorensen, T., *et al.* (2007). Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 445, 102-105.
- Rich, I. N. (1991). The effect of 5-fluorouracil on erythropoiesis. *Blood* 77, 1164-1170.
- Richardson, D. R., Neumannova, V., Nagy, E., and Ponka, P. (1995). The effect of redox-related species of nitrogen monoxide on transferrin and iron uptake and cellular proliferation of erythroleukemia (K562) cells. *Blood* 86, 3211-3219.
- Richmond, T. D., Chohan, M., and Barber, D. L. (2005). Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol* 15, 146-155.
- Rinsch, C., Dupraz, P., Schneider, B. L., Deglon, N., Maxwell, P. H., Ratcliffe, P. J., and Aebischer, P. (2002). Delivery of erythropoietin by encapsulated myoblasts in a genetic model of severe anemia. *Kidney Int* 62, 1395-1401.
- Robb, A., and Wessling-Resnick, M. (2004). Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. *Blood* 104, 4294-4299.
- Rolfs, A., Kvietikova, I., Gassmann, M., and Wenger, R. H. (1997). Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* 272, 20055-20062.
- Roque-Barreira, M. C., and Campos-Neto, A. (1985). Jacalin: an IgA-binding lectin. *J Immunol* 134, 1740-1743.

- Russell, E. S. (1979). Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet* 20, 357-459.
- Russell, M. W., Sibley, D. A., Nikolova, E. B., Tomana, M., and Mestecky, J. (1997). IgA antibody as a non-inflammatory regulator of immunity. *Biochem Soc Trans* 25, 466-470.
- Rutledge, E. A., Root, B. J., Lucas, J. J., and Enns, C. A. (1994). Elimination of the O-linked glycosylation site at Thr 104 results in the generation of a soluble human-transferrin receptor. *Blood* 83, 580-586.
- Rylski, M., Welch, J. J., Chen, Y. Y., Letting, D. L., Diehl, J. A., Chodosh, L. A., Blobel, G. A., and Weiss, M. J. (2003). GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation. *Mol Cell Biol* 23, 5031-5042.
- Saharinen, P., Takaluoma, K., and Silvennoinen, O. (2000). Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol* 20, 3387-3395.
- Sainte-Marie, J., Lafont, V., Pecheur, E. I., Favero, J., Philippot, J. R., and Bienvenue, A. (1997). Transferrin receptor functions as a signal-transduction molecule for its own recycling via increases in the internal Ca<sup>2+</sup> concentration. *Eur J Biochem* 250, 689-697.
- Salmeron, A., Borroto, A., Fresno, M., Crumpton, M. J., Ley, S. C., and Alarcon, B. (1995). Transferrin receptor induces tyrosine phosphorylation in T cells and is physically associated with the TCR zeta-chain. *J Immunol* 154, 1675-1683.
- Sato, T., Watanabe, S., Ishii, E., Tsuji, K., and Nakahata, T. (1998). Induction of the erythropoietin receptor gene and acquisition of responsiveness to erythropoietin by stem cell factor in HML/SE, a human leukemic cell line. *J Biol Chem* 273, 16921-16926.
- Sawaya, B. E., Aunis, D., and Schaeffer, E. (1996). Distinct positive and negative regulatory elements control neuronal and hepatic transcription of the human transferrin gene. *J Neurosci Res* 43, 261-272.
- Schade, A. L., and Caroline, L. (1946). An Iron-binding Component in Human Blood Plasma. *Science* 104, 340-341.
- Schaffer, F. M., Monteiro, R. C., Volanakis, J. E., and Cooper, M. D. (1991). IgA deficiency. *Immunodeficiency Rev* 3, 15-44.
- Schaffer, L., Scheid, A., Spielmann, P., Breyman, C., Zimmermann, R., Meuli, M., Gassmann, M., Marti, H. H., and Wenger, R. H. (2003). Oxygen-regulated expression of TGF-beta 3, a growth factor involved in trophoblast differentiation. *Placenta* 24, 941-950.
- Scheid, A., Wenger, R. H., Christina, H., Camenisch, I., Ferenc, A., Stauffer, U. G., Gassmann, M., and Meuli, M. (2000). Hypoxia-regulated gene expression in fetal wound regeneration and adult wound repair. *Pediatr Surg Int* 16, 232-236.
- Schmidt, P. J., Toran, P. T., Giannetti, A. M., Bjorkman, P. J., and Andrews, N. C. (2008). The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab* 7, 205-214.

- Schmidt, U., van den Akker, E., Parren-van Amelsvoort, M., Litos, G., de Bruijn, M., Gutierrez, L., Hendriks, R. W., Ellmeier, W., Lowenberg, B., Beug, H., and von Lindern, M. (2004). Btk is required for an efficient response to erythropoietin and for SCF-controlled protection against TRAIL in erythroid progenitors. *J Exp Med* *199*, 785-795.
- Schneider, C., Owen, M. J., Banville, D., and Williams, J. G. (1984). Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence. *Nature* *311*, 675-678.
- Schneider, C., Sutherland, R., Newman, R., and Greaves, M. (1982). Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9. *J Biol Chem* *257*, 8516-8522.
- Schneider, C., and Williams, J. G. (1985). Molecular dissection of the human transferrin receptor. *J Cell Sci Suppl* *3*, 139-149.
- Schofield, C. J., and Ratcliffe, P. J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* *5*, 343-354.
- Serve, H., Yee, N. S., Stella, G., Sepp-Lorenzino, L., Tan, J. C., and Besmer, P. (1995). Differential roles of PI3-kinase and Kit tyrosine 821 in Kit receptor-mediated proliferation, survival and cell adhesion in mast cells. *Embo J* *14*, 473-483.
- Shimizu, R., Komatsu, N., Nakamura, Y., Nakauchi, H., Nakabeppu, Y., and Miura, Y. (1996). Role of c-jun in the inhibition of erythropoietin receptor-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* *222*, 1-6.
- Shimon, I., and Shpilberg, O. (1995). The insulin-like growth factor system in regulation of normal and malignant hematopoiesis. *Leuk Res* *19*, 233-240.
- Shockett, P., and Stavnezer, J. (1991). Effect of cytokines on switching to IgA and alpha germline transcripts in the B lymphoma I.29 mu. Transforming growth factor-beta activates transcription of the unrearranged C alpha gene. *J Immunol* *147*, 4374-4383.
- Sokol, L., Luhovy, M., Guan, Y., Prchal, J. F., Semenza, G. L., and Prchal, J. T. (1995). Primary familial polycythemia: a frameshift mutation in the erythropoietin receptor gene and increased sensitivity of erythroid progenitors to erythropoietin. *Blood* *86*, 15-22.
- Somerville, T. C., Linch, D. C., and Khwaja, A. (2001). Growth factor withdrawal from primary human erythroid progenitors induces apoptosis through a pathway involving glycogen synthase kinase-3 and Bax. *Blood* *98*, 1374-1381.
- Spike, B. T., Dirlam, A., Dibling, B. C., Marvin, J., Williams, B. O., Jacks, T., and Macleod, K. F. (2004). The Rb tumor suppressor is required for stress erythropoiesis. *Embo J* *23*, 4319-4329.
- Sposi, N. M., Cianetti, L., Tritarelli, E., Pelosi, E., Militi, S., Barberi, T., Gabbianelli, M., Saule, E., Kuhn, L., Peschle, C., and Testa, U. (2000). Mechanisms of differential transferrin receptor expression in normal hematopoiesis. *Eur J Biochem* *267*, 6762-6774.
- Staerk, J., Kallin, A., Royer, Y., Diaconu, C. C., Dusa, A., Demoulin, J. B., Vainchenker, W., and Constantinescu, S. N. (2007). JAK2, the JAK2 V617F mutant and cytokine receptors. *Pathol Biol (Paris)* *55*, 88-91.

- Stamatoyannopoulos, G. (2005). Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Exp Hematol* 33, 259-271.
- Sui, X., Krantz, S. B., You, M., and Zhao, Z. (1998). Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. *Blood* 92, 1142-1149.
- Suzuki, N., Ohneda, O., Takahashi, S., Higuchi, M., Mukai, H. Y., Nakahata, T., Imagawa, S., and Yamamoto, M. (2002). Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality. *Blood* 100, 2279-2288.
- Syed, R. S., Reid, S. W., Li, C., Cheetham, J. C., Aoki, K. H., Liu, B., Zhan, H., Osslund, T. D., Chirino, A. J., Zhang, J., *et al.* (1998). Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature* 395, 511-516.
- Tacchini, L., Bianchi, L., Bernelli-Zazzera, A., and Cairo, G. (1999). Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 274, 24142-24146.
- Takahashi, S., Onodera, K., Motohashi, H., Suwabe, N., Hayashi, N., Yanai, N., Nabesima, Y., and Yamamoto, M. (1997). Arrest in primitive erythroid cell development caused by promoter-specific disruption of the GATA-1 gene. *J Biol Chem* 272, 12611-12615.
- Tamouza, H., Vende, F., Tiwari, M., Arcos-Fajardo, M., Vrtovsnik, F., Benhamou, M., Monteiro, R. C., and Moura, I. C. (2007). Transferrin receptor engagement by polymeric IgA1 induces receptor expression and mesangial cell proliferation: role in IgA nephropathy. *Contrib Nephrol* 157, 144-147.
- Tan, B. L., Hong, L., Munugalavadla, V., and Kapur, R. (2003). Functional and biochemical consequences of abrogating the activation of multiple diverse early signaling pathways in Kit. Role for Src kinase pathway in Kit-induced cooperation with erythropoietin receptor. *J Biol Chem* 278, 11686-11695.
- Tan, C. C., Eckardt, K. U., Firth, J. D., and Ratcliffe, P. J. (1992). Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am J Physiol* 263, F474-481.
- Taylor, H. P., and Dimmock, N. J. (1985). Mechanism of neutralization of influenza virus by secretory IgA is different from that of monomeric IgA or IgG. *J Exp Med* 161, 198-209.
- Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J. M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G., and Ihle, J. N. (1998). Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 93, 841-850.
- Testa, U. (2004). Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia* 18, 1176-1199.
- Thommes, K., Lennartsson, J., Carlberg, M., and Ronnstrand, L. (1999). Identification of Tyr-703 and Tyr-936 as the primary association sites for Grb2 and Grb7 in the c-Kit/stem cell factor receptor. *Biochem J* 341 ( Pt 1), 211-216.
- Tilbrook, P. A., Ingley, E., Williams, J. H., Hibbs, M. L., and Klinken, S. P. (1997). Lyn tyrosine kinase is essential for erythropoietin-induced differentiation of J2E erythroid cells. *Embo J* 16, 1610-1619.

- Timokhina, I., Kissel, H., Stella, G., and Besmer, P. (1998). Kit signaling through PI 3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation. *Embo J* 17, 6250-6262.
- Toth, I., Yuan, L., Rogers, J. T., Boyce, H., and Bridges, K. R. (1999). Hypoxia alters iron-regulatory protein-1 binding capacity and modulates cellular iron homeostasis in human hepatoma and erythroleukemia cells. *J Biol Chem* 274, 4467-4473.
- Trowbridge, I. S., and Shackelford, D. A. (1986). Structure and function of transferrin receptors and their relationship to cell growth. *Biochem Soc Symp* 51, 117-129.
- Tsai, F. Y., Keller, G., Kuo, F. C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F. W., and Orkin, S. H. (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371, 221-226.
- Tsang, A. P., Visvader, J. E., Turner, C. A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M. J., Crossley, M., and Orkin, S. H. (1997). FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* 90, 109-119.
- Turjanski, A. G., Vaque, J. P., and Gutkind, J. S. (2007). MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* 26, 3240-3253.
- Uddin, S., Ah-Kang, J., Ulaszek, J., Mahmud, D., and Wickrema, A. (2004). Differentiation stage-specific activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 147-152.
- Ueda, Y., Hirai, S., Osada, S., Suzuki, A., Mizuno, K., and Ohno, S. (1996). Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem* 271, 23512-23519.
- Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203-212.
- Uoshima, N., Ozawa, M., Kimura, S., Tanaka, K., Wada, K., Kobayashi, Y., and Kondo, M. (1995). Changes in c-Kit expression and effects of SCF during differentiation of human erythroid progenitor cells. *Br J Haematol* 91, 30-36.
- van Biesen, T., Hawes, B. E., Luttrell, D. K., Krueger, K. M., Touhara, K., Porfiri, E., Sakaue, M., Luttrell, L. M., and Lefkowitz, R. J. (1995). Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* 376, 781-784.
- van der Boog, P. J., van Zandbergen, G., de Fijter, J. W., Klar-Mohamad, N., van Seggelen, A., Brandtzaeg, P., Daha, M. R., and van Kooten, C. (2002). Fc alpha RI/CD89 circulates in human serum covalently linked to IgA in a polymeric state. *J Immunol* 168, 1252-1258.
- van Dijk, T. B., van Den Akker, E., Amelsvoort, M. P., Mano, H., Lowenberg, B., and von Lindern, M. (2000). Stem cell factor induces phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent Lyn/Tec/Dok-1 complex formation in hematopoietic cells. *Blood* 96, 3406-3413.
- van Egmond, M., Damen, C. A., van Spriël, A. B., Vidarsson, G., van Garderen, E., and van de Winkel, J. G. (2001). IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol* 22, 205-211.

- Van Epps, D. E., and Williams, R. C., Jr. (1976). Suppression of leukocyte chemotaxis by human IgA myeloma components. *J Exp Med* 144, 1227-1242.
- Vaziri, N. D., Oveisi, F., Reyes, G. A., and Zhou, X. J. (1996). Dysregulation of melatonin metabolism in chronic renal insufficiency: role of erythropoietin-deficiency anemia. *Kidney Int* 50, 653-656.
- Vivanco, I., and Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501.
- von Bonsdorff, L., Sahlstedt, L., Ebeling, F., Ruutu, T., and Parkkinen, J. (2003). Apotransferrin administration prevents growth of *Staphylococcus epidermidis* in serum of stem cell transplant patients by binding of free iron. *FEMS Immunol Med Microbiol* 37, 45-51.
- von Lindern, M., Schmidt, U., and Beug, H. (2004). Control of erythropoiesis by erythropoietin and stem cell factor: a novel role for Bruton's tyrosine kinase. *Cell Cycle* 3, 876-879.
- von Lindern, M., Zauner, W., Mellitzer, G., Steinlein, P., Fritsch, G., Huber, K., Lowenberg, B., and Beug, H. (1999). The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro. *Blood* 94, 550-559.
- Waheed, A., Parkkila, S., Saarnio, J., Fleming, R. E., Zhou, X. Y., Tomatsu, S., Britton, R. S., Bacon, B. R., and Sly, W. S. (1999). Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1579-1584.
- Wallace, D. F., Summerville, L., Lusby, P. E., and Subramaniam, V. N. (2005). First phenotypic description of transferrin receptor 2 knockout mouse, and the role of hepcidin. *Gut* 54, 980-986.
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5510-5514.
- Wang, J., Chen, G., Muckenthaler, M., Galy, B., Hentze, M. W., and Pantopoulos, K. (2004). Iron-mediated degradation of IRP2, an unexpected pathway involving a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase activity. *Mol Cell Biol* 24, 954-965.
- Weaver, A., Ryder, D., Crowther, D., Dexter, T. M., and Testa, N. G. (1996). Increased numbers of long-term culture-initiating cells in the apheresis product of patients randomized to receive increasing doses of stem cell factor administered in combination with chemotherapy and a standard dose of granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 88, 3323-3328.
- Weber-Mzell, D., Kotanko, P., Hauer, A. C., Goriup, U., Haas, J., Lanner, N., Erwa, W., Ahmaida, I. A., Haitchi-Petnehazy, S., Stenzel, M., *et al.* (2004). Gender, age and seasonal effects on IgA deficiency: a study of 7293 Caucasians. *Eur J Clin Invest* 34, 224-228.
- Weiss, M. J., Keller, G., and Orkin, S. H. (1994). Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev* 8, 1184-1197.
- Welch, S., and Langmead, L. (1990). A comparison of the structure and properties of normal human transferrin and a genetic variant of human transferrin. *Int J Biochem* 22, 275-282.

- Wessely, O., Deiner, E. M., Beug, H., and von Lindern, M. (1997). The glucocorticoid receptor is a key regulator of the decision between self-renewal and differentiation in erythroid progenitors. *Embo J* 16, 267-280.
- West, A. P., Jr., Bennett, M. J., Sellers, V. M., Andrews, N. C., Enns, C. A., and Bjorkman, P. J. (2000). Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE. *J Biol Chem* 275, 38135-38138.
- Whyatt, D., Lindeboom, F., Karis, A., Ferreira, R., Milot, E., Hendriks, R., de Bruijn, M., Langeveld, A., Gribnau, J., Grosveld, F., and Philipsen, S. (2000). An intrinsic but cell-nonautonomous defect in GATA-1-overexpressing mouse erythroid cells. *Nature* 406, 519-524.
- Williams, A. M., and Enns, C. A. (1991). A mutated transferrin receptor lacking asparagine-linked glycosylation sites shows reduced functionality and an association with binding immunoglobulin protein. *J Biol Chem* 266, 17648-17654.
- Wilton, J. M. (1978). Suppression by IgA of IgG-mediated phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. *Clin Exp Immunol* 34, 423-428.
- Wines, B. D., Sardjono, C. T., Trist, H. H., Lay, C. S., and Hogarth, P. M. (2001). The interaction of Fc alpha RI with IgA and its implications for ligand binding by immunoreceptors of the leukocyte receptor cluster. *J Immunol* 166, 1781-1789.
- Wognum, A. W., Lansdorp, P. M., Humphries, R. K., and Krystal, G. (1990). Detection and isolation of the erythropoietin receptor using biotinylated erythropoietin. *Blood* 76, 697-705.
- Wu, H., Klingmuller, U., Besmer, P., and Lodish, H. F. (1995a). Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* 377, 242-246.
- Wu, H., Lee, S. H., Gao, J., Liu, X., and Iruela-Arispe, M. L. (1999). Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* 126, 3597-3605.
- Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., and Lodish, H. F. (1995b). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 83, 59-67.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J., and Greenberg, M. E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326-1331.
- Yokomizo, T., Takahashi, S., Mochizuki, N., Kuroha, T., Ema, M., Wakamatsu, A., Shimizu, R., Ohneda, O., Osato, M., Okada, H., *et al.* (2007). Characterization of GATA-1(+) hemangioblastic cells in the mouse embryo. *Embo J* 26, 184-196.
- Yu, X., Shacka, J. J., Eells, J. B., Suarez-Quian, C., Przygodzki, R. M., Beleslin-Cokic, B., Lin, C. S., Nikodem, V. M., Hempstead, B., Flanders, K. C., *et al.* (2002). Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development* 129, 505-516.
- Zang, H., Sato, K., Nakajima, H., McKay, C., Ney, P. A., and Ihle, J. N. (2001). The distal region and receptor tyrosines of the Epo receptor are non-essential for in vivo erythropoiesis. *Embo J* 20, 3156-3166.

Zermati, Y., Fichelson, S., Valensi, F., Freyssinier, J. M., Rouyer-Fessard, P., Cramer, E., Guichard, J., Varet, B., and Hermine, O. (2000). Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. *Exp Hematol* **28**, 885-894.

Zermati, Y., Garrido, C., Amsellem, S., Fishelson, S., Bouscary, D., Valensi, F., Varet, B., Solary, E., and Hermine, O. (2001). Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* **193**, 247-254.

Zhang, A. S., Xiong, S., Tsukamoto, H., and Enns, C. A. (2004). Localization of iron metabolism-related mRNAs in rat liver indicate that HFE is expressed predominantly in hepatocytes. *Blood* **103**, 1509-1514.

Zhang, H., Akman, H. O., Smith, E. L., Zhao, J., Murphy-Ullrich, J. E., and Batuman, O. A. (2003a). Cellular response to hypoxia involves signaling via Smad proteins. *Blood* **101**, 2253-2260.

Zhang, J., Socolovsky, M., Gross, A. W., and Lodish, H. F. (2003b). Role of Ras signaling in erythroid differentiation of mouse fetal liver cells: functional analysis by a flow cytometry-based novel culture system. *Blood* **102**, 3938-3946.

Zhang, W., and Lachmann, P. J. (1994). Glycosylation of IgA is required for optimal activation of the alternative complement pathway by immune complexes. *Immunology* **81**, 137-141.

Zhao, W., Kitidis, C., Fleming, M. D., Lodish, H. F., and Ghaffari, S. (2006). Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood* **107**, 907-915.

Zon, L. I., Youssoufian, H., Mather, C., Lodish, H. F., and Orkin, S. H. (1991). Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10638-10641.

Zsebo, K. M., Williams, D. A., Geissler, E. N., Broudy, V. C., Martin, F. H., Atkins, H. L., Hsu, R. Y., Birkett, N. C., Okino, K. H., Murdock, D. C., and et al. (1990). Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* **63**, 213-224.

# Annexe : Liste des publications

## 1 Articles scientifiques

### **Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1 p149**

Jean-Antoine Ribeil, Yael Zermati, Julie Vandekerckhove, Severine Cathelin, Joelle Kersual, Michaël Dussiot, Séverine Coulon, Ivan Cruz Moura, Ann Zeuner, Thomas Kirkegaard-Sørensen, Bruno Varet, Eric Solary, Carmen Garrido et Olivier Hermine.

**Nature**. 2007 Jan 4;445(7123):102-5

### **Prevention of Mantle Lymphoma Tumor Establishment by Routing Transferrin Receptor toward Lysosomal Compartments p164**

Yves Lepelletier, Valérie Camara-Clayette, Hulin Jin, Aurélie Hermant, Séverine Coulon, Michaël Dussiot, Michelle Arcos-Fajardo, Cédric Baude, Danielle Canionni, Richard Delarue, Nicole Brousse, Philippe Benaroch, Marc Benhamou, Vincent Ribrag, Renato C. Monteiro, Ivan C. Moura, et Olivier Hermine.

**Cancer Research** 2007; 67: (3). February 1, 2007

### **Human Erythroleukemia: Is the two-hit model of mouse leukemogenesis valid in human disease?**

**P175**

Séverine Coulon, Julie Vandekerckhove, Michaël Dussiot, Céline Callens, Felipe Suarez, Joelle Kersual, Vahid Asnafi, Zakia Belaid, Geneviève Courtois, Stephane Giraudier, Patrice Dubreuil, Yves Lepelletier, Ivan C. Moura, Olivier Hermine

**Leukemia**. 2007 Oct;21(10):2212-4

### **Targeting iron homeostasis induces cellular differentiation and synergizes with differentiating agents in acute myeloid leukemia p181**

Céline Callens, Jérôme Naudin, Séverine Coulon, Isabelle Radford-Weiss, Nicolas Boissel, Emmanuel Raffoux, Pamela Huey Mei Wang, Vahid Asnafi, Philippe Dessen, Danielle Canioni, Olivia Chandesris, Marie Therese Rubio, Marc Benhamou, Hervé Dombret, Elizabeth Macintyre, Renato C. Monteiro, Ivan C. Moura et Olivier Hermine.

**Article en révision**

## 2 Revues

**Recent advances in adult T-cell leukemia therapy: focus on a new anti-transferrin receptor monoclonal antibody** **p219**

Céline Callens, Ivan Cruz Moura, Yves Lepelletier, Séverine Coulon, Amédé Renand, Michael Dussiot, David Ghez, Marc Benhamou, Renato C. Monteiro, Ali Bazarbachi, Olivier Hermine.

**Leukemia.** 2008 Jan;22(1):42-8

**L'érythropoïèse tardive : une mort avortée ?** **p226**

Geneviève Courtois, Julie Vandekerckhove, Mickael Dussiot, Joëlle Kersual, Séverine Coulon, Zakia Belaid, Yael Zermati, Jean-Antoine Ribeil, Olivier Hermine

**Hématologie** 2007 ; 13 (6) : 400-8

# **Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1**

Jean-Antoine Ribeil, Yael Zermati, Julie Vandekerckhove, Severine Cathelin, Joelle Kersual, Michaël Dussiot, Séverine Coulon, Ivan Cruz Moura, Ann Zeuner, Thomas Kirkegaard-Sørensen, Bruno Varet, Eric Solary, Carmen Garrido et Olivier Hermine.

**Nature.** 2007 Jan 4;445(7123):102-5

## **Contexte du travail:**

GATA-1 est le facteur de transcription principal de la différenciation érythroïde terminale car il active l'expression de protéines majeures pour les érythroblastes (R-Epo,  $\alpha$  et  $\beta$ globine...) et régule positivement la protéine anti-apoptotique Bcl-XL. Au cours de la différenciation érythroïde, la caspase-3 est transitoirement activée, ce qui permet le clivage de protéines impliquées dans l'intégrité du noyau (Lamine B) ou la condensation de la chromatine (Acinus). Cependant l'apoptose n'est pas induite et GATA-1, bien que co-localisant avec la caspase-3, n'est pas clivée. Ce travail décrit le mécanisme de protection de GATA-1 du clivage par la caspase-3 au cours de la différenciation érythroïde terminale.

## **Résultats:**

Ce travail montre que la protéine chaperonne Hsp70 protège les érythroblastes de l'apoptose cellulaire dépendante des caspases en se fixant au facteur de transcription GATA-1. La localisation subcellulaire de cette protéine est dépendante de l'Epo. En présence d'Epo, Hsp70 s'associe à GATA-1 dans le noyau, le protégeant ainsi du clivage par la caspase-3. En absence d'Epo, il y a export nucléaire d'Hsp70 et clivage de GATA-1. Dans ce modèle, l'Epo détermine le devenir des érythroblastes (apoptose versus différenciation) en aval de l'activation de la caspase-3 en régulant la localisation subcellulaire d'Hsp70.

## **Perspectives:**

Il reste, à l'issue de ce travail, à déterminer quels sont les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la localisation cellulaire d'Hsp70. D'autre part, il est intéressant de savoir s'il existe des anomalies d'expression ou de localisation d'Hsp70 dans des pathologies érythroïdes comme les syndromes myélodysplasiques. Ces études ont fait l'objet du travail de thèse de Melle Julie Vandekerckhove.

## LETTERS

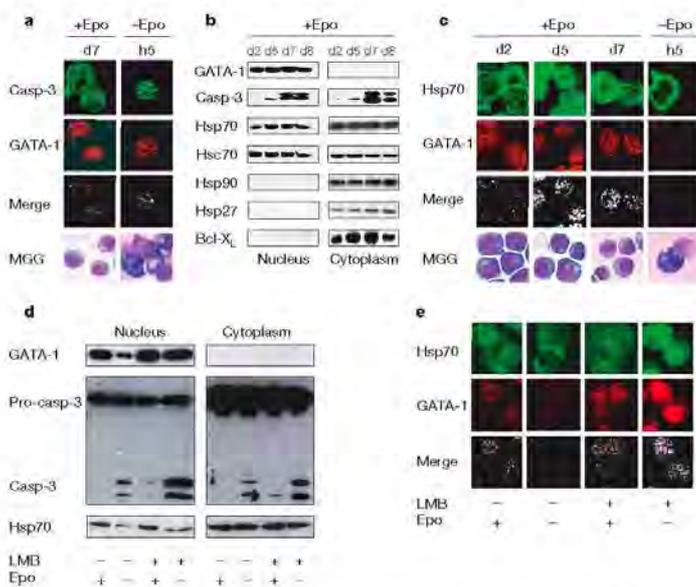
## Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1

Jean-Antoine Ribeil<sup>1,4</sup>, Yael Zermati<sup>1,2,4</sup>, Julie Vandekerckhove<sup>1</sup>, Severine Cathelin<sup>2</sup>, Joelle Kersual<sup>1</sup>, Michaël Dussiot<sup>1</sup>, Séverine Coulon<sup>1</sup>, Ivan Cruz Moura<sup>1</sup>, Ann Zeuner<sup>3</sup>, Thomas Kirkegaard-Sørensen<sup>1</sup>, Bruno Varet<sup>1,5</sup>, Eric Solary<sup>2</sup>, Carmen Garrido<sup>2</sup> & Olivier Hermine<sup>1,5</sup>

Caspase-3 is activated during both terminal differentiation and erythropoietin-starvation-induced apoptosis of human erythroid precursors. The transcription factor GATA-1, which performs an essential function in erythroid differentiation<sup>1,2</sup> by positively regulating promoters of erythroid and anti-apoptotic genes<sup>4-6</sup>, is cleaved by caspases in erythroid precursors undergoing cell death upon erythropoietin starvation or engagement of the death receptor Fas<sup>7,8</sup>. In contrast, by an unknown mechanism, GATA-1 remains uncleaved when these cells undergo terminal differentiation upon stimulation with Epo<sup>9-11</sup>. Here we show that during differentiation, but not during apoptosis, the chaperone protein Hsp70 protects GATA-1 from caspase-mediated proteolysis. At the onset of caspase activation, Hsp70 co-localizes and interacts with GATA-1 in the nucleus of erythroid precursors undergoing terminal differentiation. In contrast, erythropoietin starvation induces the nuclear export of Hsp70 and the cleavage of GATA-1. In an *in vitro* assay,

Hsp70 protects GATA-1 from caspase-3-mediated proteolysis through its peptide-binding domain. The use of RNA-mediated interference to decrease the Hsp70 content of erythroid precursors cultured in the presence of erythropoietin leads to GATA-1 cleavage, a decrease in haemoglobin content, downregulation of the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-X<sub>L</sub>, and cell death by apoptosis. These effects are abrogated by the transduction of a caspase-resistant GATA-1 mutant. Thus, in erythroid precursors undergoing terminal differentiation, Hsp70 prevents active caspase-3 from cleaving GATA-1 and inducing apoptosis.

During erythropoiesis, caspase activation is required for maturation of erythroblasts. In this process, however, in contrast to what occurs during the apoptosis of erythroblasts, some targets, including GATA-1, remain uncleaved (Supplementary Fig. S1). The fate of erythroblasts is therefore determined downstream of caspase activation by an unknown mechanism.



**Figure 1 | Hsp70 nuclear expression and co-localization with GATA-1 in differentiating erythroblasts is lost during erythropoietin-starvation-induced apoptosis.** **a**, Top three rows: co-localization (white) of GATA-1 (red) and active caspase-3 (p17 subunit, green) at day 7 with erythropoietin (+Epo, d7) or after cytokine starvation for 5 h (-Epo, h5). Bottom row: morphological (MGG) analysis of cytokine-deprived cells (magnification  $\times 40$ ). **b**, Protein expression for the indicated days (d2 to d8) in the presence of erythropoietin. **c**, Top three rows: Hsp70 (green) and GATA-1 (red) co-localize in the nucleus in the presence of erythropoietin. Bottom row: MGG analysis ( $n = 5$ ). **d**, **e**, Immunoblot analysis (**d**) and confocal microscopy analysis (**e**) at day 4, pretreated (+) or not (-) with 20 nM leptomycin B (LMB) for 1 h before being starved of erythropoietin (-Epo) or not (+Epo) for 5 h. One representative experiment of three is shown. Casp, caspase.

<sup>1</sup>ENRS UMR 8147, Faculté de Médecine et Université René Descartes Paris V, Institut Fédératif Necker, 75270 Paris, France. <sup>2</sup>INSERM UMR 517, 21079 Dijon, France. <sup>3</sup>Department of Hematology and Oncology, Istituto Superiore di Sanità, 00161 Roma, Italy. <sup>4</sup>Department of Apoptosis, Institute for Cancer Biology, Danish Cancer Society, Strandboulevarden 49, 2100 Copenhagen. <sup>5</sup>Department of Hematology, Faculté de Médecine et Université René Descartes Paris V, Assistance publique des hôpitaux de Paris, Necker, 75270 Paris, France. \*These authors contributed equally to this work.

During erythroid differentiation, caspase-3, and to a smaller extent caspase-7 but not other caspases (Supplementary Fig. S2), is found activated in the nucleus and co-localized with GATA-1 (Fig. 1a, b). Bcl-X<sub>L</sub>, a key survival factor in erythropoiesis, prevents the release of pro-apoptotic molecules from the mitochondria to the cytosol, upstream of caspase activation<sup>13,15</sup>; it therefore may not account for the differential effect of activated caspases in erythropoietin-stimulated and erythropoietin-deprived erythroblasts. Other protective proteins include stress-inducible proteins such as the heat-shock proteins Hsp90, Hsp70 and Hsp27. These molecular chaperones modulate the assembly, transport and folding of other proteins<sup>14</sup>. They also have key functions in cell survival after stressful stimuli, for example by associating with apoptogenic proteins downstream of the mitochondria, including cytochrome *c* (ref. 15), Apaf-1 (ref. 16) and apoptosis-inducing factor (AIF)<sup>17</sup>. The inducible Hsp70 was shown also to rescue cells from apoptosis at a later stage than any other known survival factor, downstream of caspase activation<sup>18</sup>. Although its role is unknown, Hsp70 is expressed constitutively in erythroid cells of *Xenopus laevis*<sup>9</sup>. On the basis of these observations, we examined whether Hsp70 was expressed during human erythroid differentiation and whether it could protect GATA-1 from cleavage by activated caspases. We studied Hsp70 expression, localization and interaction with GATA-1 during both erythroblast differentiation and erythropoietin-starvation-induced apoptosis.

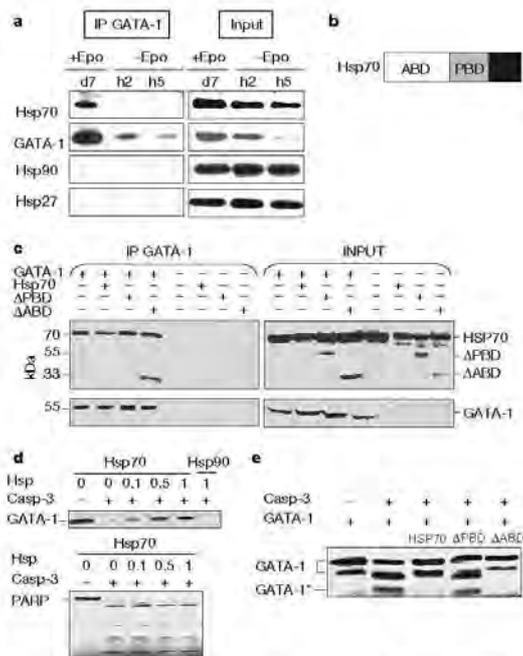
Hsp27, Hsp70 and Hsp90 proteins were expressed constitutively in human erythroblasts undergoing differentiation (Fig. 1b). Of these three proteins, only Hsp70 was highly expressed in the nucleus of differentiating cells (Fig. 1b), where it co-localized with GATA-1 (Fig. 1c). Similar results were found in fresh bone marrow glycoporphin-A-positive cells (Supplementary Fig. S3), excluding the possibility that the nuclear expression of Hsp70 was the consequence of cell culture. The intensity of GATA-1 and Hsp70 co-localization increased with the level of caspase activation (Fig. 1b, c). In contrast, during erythropoietin-starvation-induced apoptosis, Hsp70 lost nuclear localization, which correlated with a decreased expression of GATA-1 (Fig. 1c–e), indicating caspase-3-mediated cleavage<sup>8</sup>. Addition of the Crm1-mediated nuclear export inhibitor leptomycin B to erythropoietin-starved cells prevented the nuclear export of Hsp70 and degradation of GATA-1, despite a higher level of activated caspase-3 than observed during apoptosis (Fig. 1d, e). Moreover, in the presence of leptomycin B, Hsp70 co-localized with GATA-1 in the nucleus of erythropoietin-starved erythroblasts (Fig. 1d, e).

Immunoprecipitation experiments on whole-cell extracts (Fig. 2a) as well as nuclear extracts (not shown) from differentiated erythroblasts demonstrated that Hsp70 co-immunoprecipitated with GATA-1, whereas neither Hsp90 nor Hsp27 interacted with the transcription factor. This interaction seemed to be specific because Hsp70 did not interact with lamin B, another nuclear protein that is cleaved by caspases in differentiating erythroid cells<sup>9</sup>, or with acinus (data not shown). By using Hsp70 deletion mutants, we observed that binding of Hsp70 to GATA-1 involved the peptide-binding domain of Hsp70 (Fig. 2b, c). After withdrawal of erythropoietin, co-immunoprecipitation between Hsp70 and GATA-1 was decreased as a consequence of GATA-1 cleavage, but the remaining Hsp70 in the nucleus still interfered with and protected GATA-1, as demonstrated by increasing GATA-1 input (Supplementary Fig. S4). Taken together, these data indicate that the peptide-binding domain of Hsp70 was required to maintain GATA-1 integrity when caspases were activated during erythroid differentiation.

Accordingly, an *in vitro* proteolysis assay showed that recombinant Hsp70 protected GATA-1 from cleavage by caspase-3 in a dose-dependent manner, whereas recombinant Hsp90 did not (Fig. 2d). The Hsp70-mediated protection seemed to be protein-specific because, in this *in vitro* assay, Hsp70 did not prevent the caspase-3-induced cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase, a protein cleaved in erythroid cells that are undergoing differentiation (Fig. 2d). In accordance with co-immunoprecipitation experiments, the GATA-1

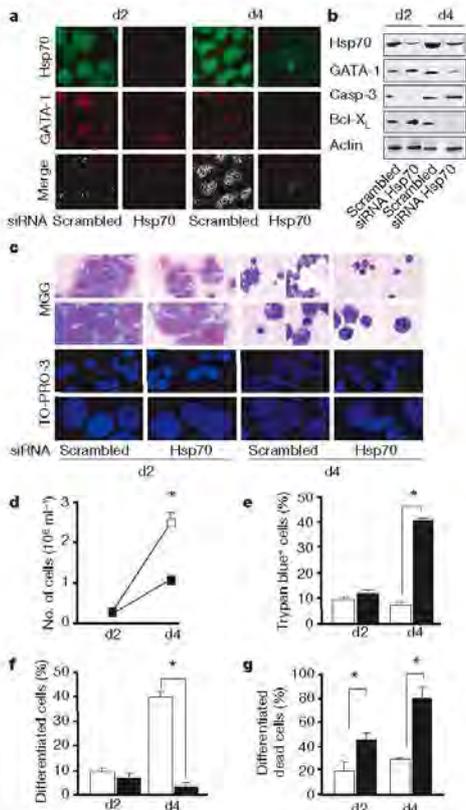
protection was lost when the peptide-binding domain of Hsp70 was deleted (Fig. 2c).

To further show the role of Hsp70 in determining the fate of erythroblasts, Hsp70 expression was inhibited with an approach involving RNA-mediated interference. Transient transfection of Hsp70-specific short interfering RNAs (siRNA Hsp70) in erythroid precursors significantly decreased the Hsp70 protein level 7.5-fold and 4-fold at days 2 and 4, respectively (Fig. 3a, b); this decrease was observed both in the nucleus and in the cytoplasm (Supplementary Fig. S5). At day 6, Hsp70 level in Hsp70-specific siRNA-transfected cells had returned to the level observed in scramble siRNA-transfected erythroid cells (data not shown). To achieve a greater inhibition of Hsp70 at the time of onset of caspase-3 activation, terminal erythroid differentiation was accelerated by omitting stem cell factor (SCF) from the culture medium<sup>20</sup>, because this omission did not increase cell apoptosis (data not shown). In these culture conditions, caspase-3 remained inactivated at day 2 and no significant difference was observed between Hsp70-specific and control siRNA-transfected cells with regard to GATA-1 expression, apoptosis and cell differentiation. At the onset of caspase-3 activation (day 4), GATA-1 remained intact in control siRNA-transfected cells, whereas the protein was almost completely degraded in Hsp70-depleted cells (Fig. 3a, b). As



**Figure 2** | Co-immunoprecipitation of GATA-1 and Hsp70 during erythroid differentiation. **a**, Immunoprecipitation (IP) of GATA-1 in whole cell extracts at day 7 with erythropoietin (+Epo, d7) or after cytokine starvation for 2 and 5 h (-Epo, h2 and h5), and immunoblotting for indicated proteins. **b**, Representation of Hsp70: ATP-binding domain (ABD) and peptide-binding domain (PBD). **c**, Immunoprecipitation of GATA-1 in GATA-1-transfected HeLa cells transfected with plasmids encoding Hsp70 or mutant ( $\Delta$ ABD,  $\Delta$ PBD) proteins. **d**, **e**, SDS-PAGE analysis of *in vitro*-translated <sup>35</sup>S-labelled GATA-1 and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) exposed to recombinant caspase-3 and increasing amounts (0–1  $\mu$ g) of recombinant Hsp70 or Hsp90 (1  $\mu$ g) (**d**) or full-length or deleted mutants of Hsp70 (**e**). GATA-1\* indicates a GATA-1 cleaved fragment. In all panels, one representative experiment of three is shown. Casp, caspase.

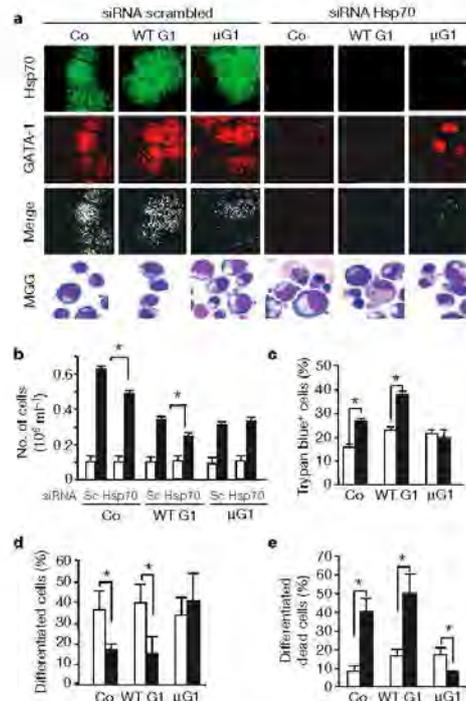
expected, the degradation of GATA-1 in Hsp70-depleted erythroblasts at day 4 was associated with a strong decrease in the expression of GATA-1-regulated gene products; for example, fewer than 10% of cells were haemoglobinized, in comparison with almost 50% in control cells ( $P < 0.005$ ; data not shown) and Bcl-X<sub>L</sub> protein level was decreased (Fig. 3b). Depletion of Hsp70 also markedly decreased the total cell number (Fig. 3d) while increasing the rate of cell death at day 4 (40% in Hsp70-depleted versus 7% in control siRNA-transfected cells;  $P = 0.007$ ; Fig. 3e). Morphological analysis of cells indicated that Hsp70 depletion induced a decrease in cell differentiation (Fig. 3c, f); that is, the proportion of immature erythroblasts (identified by their basophilic cytoplasm and larger size) with nuclear chromatin condensation was only 10% in Hsp70-depleted cells at day 4, which was similar to that in control cells, whereas the proportion of mature erythroblasts (identified by their acidophilic cytoplasm and smaller size) exhibiting nuclear features of apoptosis was about 90% in Hsp70-depleted cells ( $P = 0.0004$ ) (Fig. 3c, g).



**Figure 3 | Decreased Hsp70 content induces death of erythroblasts undergoing differentiation.** Analysis of erythroblast progenitors 2 days (d2) and 4 days (d4) after transfection with siRNA targeting Hsp70 or a scrambled siRNA. **a**, Confocal microscopy analysis of GATA-1 and Hsp70 expression. **b**, Immunoblot analysis of indicated proteins in whole-cell lysates. **c**, Cell and nucleus morphology assessed by MGG and TO-PRO-3 analysis at various magnifications. **d**, Growth curves. **e**, Percentage of cell death. **f**, Percentage of mature cells. **g**, Percentage of mature cells exhibiting morphological features of apoptosis. Graphed results are means and s.e.m. for three independent experiments; open bars and symbols, scrambled siRNA; filled bars and symbols, Hsp70 siRNA. Asterisk,  $P < 0.05$ .

Similar results were obtained when Hsp70 expression was decreased by the use of antisense oligonucleotides (Supplementary Fig. S6). We also observed the same results in the presence of SCP, by using a stealth Hsp70 siRNA that exhibits a longer half-life than standard siRNAs, ruling out an increase in apoptosis due to the lack of SCF in the culture medium (Supplementary Fig. S7). Taken together, these findings indicated that Hsp70 depletion prevented erythroblast cells from undergoing terminal differentiation by allowing activated caspase-3 to trigger apoptotic cell death.

To check whether the effect of Hsp70-targeting siRNA was due to GATA-1 cleavage rather than to a general effect on cellular metabolism, a previously described GATA-1 mutant ( $\mu$ G1)<sup>8</sup> that resists caspase-mediated cleavage was retrovirally transduced in CD34-positive cells. The same vector encoding wild-type GATA-1 (WT G1) and the empty vector were used as controls. Cell proliferation was decreased by 50% both in cells transfected with wild-type G1 and cells in transfected with  $\mu$ G1, in accordance with previous observations<sup>21</sup>. As expected, transfection with siRNA targeting Hsp70 in cells transfected with either the empty or the wild-type GATA-1-encoding vectors resulted in a decrease in GATA-1 expression (Fig. 4a), cell expansion (Fig. 4b) and cell maturation (Fig. 4d), while increasing



**Figure 4 | Transduction of caspase-resistant GATA-1 mutant protects erythroblasts from death after depletion of Hsp70.** CD34<sup>+</sup> haematopoietic cells transduced with an empty vector (Co), a vector encoding wild-type GATA-1 (WT G1), or Asp125-mutated GATA-1 ( $\mu$ G1) were transfected with Hsp70 siRNA or scrambled siRNA (Sc). **a**, Confocal microscopy analysis of GATA-1 and Hsp70 expression. Cell maturation was assessed by morphological (MGG) analysis. **b**, Cell expansion assessed at day 2 (open bars) or day 4 (filled bars). **c**, Percentage of trypan-blue-positive cells. **d**, Percentage of differentiated cells. **e**, Percentage of differentiated cells exhibiting morphological features of apoptosis all at day 4. In **c-e**, open bars, scrambled siRNA; filled bars, Hsp70 siRNA. Graphed results are means and s.e.m. for three independent experiments. Asterisk,  $P < 0.05$ .

mature cell death (Fig. 4c, e). In contrast, Hsp70 siRNA had no significant effect on  $\mu$ GATA-1 transduced cells (Fig. 4). Taken together, these results suggested that Hsp70 protected differentiating erythroblasts from apoptosis through the inhibition of GATA-1 cleavage by caspase-3.

On the basis of these observations, we propose a model in which erythropoietin protects erythroid cells undergoing differentiation from caspase-mediated apoptosis by regulating the cellular localization of Hsp70 (Supplementary Fig. S8). This model provides a potential explanation for the lack of cell death when caspases are activated in erythroid cells undergoing terminal differentiation<sup>2,41</sup>. Bcl-X<sub>L</sub> is a key protein in erythroid progenitor survival<sup>4</sup>; it acts by preventing the release of pro-apoptotic molecules from the mitochondria<sup>22</sup>. Our results strongly indicate that Hsp70 is another key erythroid antiapoptotic protein that acts both upstream and downstream of Bcl-X<sub>L</sub>. First, by protecting GATA-1 from caspase-3-mediated cleavage, Hsp70 maintains Bcl-X<sub>L</sub> expression, in synergy with erythropoietin. Second, Hsp70 saves erythroid progenitors in which caspases are activated from apoptosis-inducing GATA-1 proteolysis. We cannot exclude the possibility that, in addition to these two effects, Hsp70 limits caspase-3 activation by interacting with Apaf-1, thus preventing the formation of the apoptosome<sup>16,23</sup>.

Thus, our data indicate that the fate of erythroblasts—apoptosis versus differentiation—is determined downstream of caspase activation by the nuclear localization of Hsp70.

## METHODS

Erythroid cells were generated as described previously<sup>24</sup>. Details of reagents and protocols for cell proliferation and differentiation analysis, immunoblot analysis, immunoprecipitation, transfection of siRNAs or antisense cDNA targeting Hsp70 in erythroid progenitors, the production of retroviral particles and the infection of haematopoietic progenitors, the generation of Hsp70 mutants, *in vitro* GATA-1 cleavage assays and confocal fluorescence microscopy analysis are provided in Supplementary Methods. Statistical analyses were performed with the Statview software package. Comparisons were made by analysis of variance. Data are expressed as means and s.e.m. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

Received 16 June; accepted 25 October 2006.

Published online 10 December 2006.

1. Fujiwara, Y. *et al.* Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 12355–12358 (1996).
2. Pevny, L. *et al.* Erythroid differentiation in chimeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* **349**, 257–260 (1991).
3. Weiss, M. J., Keller, G. & Orkin, S. H. Novel insights into erythroid development revealed through *in vitro* differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev.* **8**, 1184–1197 (1994).
4. Motoyama, N. *et al.* Bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *J. Exp. Med.* **189**, 1691–1698 (1999).
5. Weiss, M. J. & Orkin, S. H. Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 9623–9627 (1995).

6. Gregory, T. *et al.* GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-x<sub>L</sub> expression. *Blood* **94**, 87–96 (1999).
7. Gregori, P. A. & Bandurant, M. C. Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythroid progenitors. *J. Cell Physiol.* **178**, 133–143 (1999).
8. De Maria, R. *et al.* Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* **401**, 489–493 (1999).
9. Zermati, Y. *et al.* Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J. Exp. Med.* **193**, 247–254 (2001).
10. Carille, G. W., Smith, D. H. & Wiedmann, M. Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood* **103**, 4310–4316 (2004).
11. Kolbus, A. *et al.* Raf-1 antagonizes erythroid differentiation by restraining caspase activation. *J. Exp. Med.* **196**, 1347–1353 (2002).
12. Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483–487 (1999).
13. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322–1326 (1998).
14. Gornio, C. *et al.* HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle* **2**, 579–584 (2003).
15. Bruey, J. M. *et al.* Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nature Cell Biol.* **2**, 645–652 (2000).
16. Beere, H. M. *et al.* Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biol.* **2**, 469–475 (2000).
17. Ravagnan, L. *et al.* Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nature Cell Biol.* **3**, 839–843 (2001).
18. Jäntelä, M. *et al.* Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J.* **17**, 6124–6134 (1998).
19. Winning, R. S. & Browder, L. W. Changes in heat shock protein synthesis and hsp70 gene transcription during erythropoiesis of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **128**, 111–120 (1988).
20. Muta, K. *et al.* Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. *Blood* **86**, 572–580 (1995).
21. Munugalavada, V. *et al.* Repression of c-kit and its downstream substrates by GATA-1 inhibits cell proliferation during erythroid maturation. *Mol. Cell Biol.* **25**, 6747–6759 (2005).
22. Gregori, P. A. & Bandurant, M. C. The roles of Bcl-X<sub>L</sub> and apopain in the control of erythropoiesis by erythropoietin. *Blood* **90**, 630–640 (1997).
23. Saleh, A. *et al.* Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature Cell Biol.* **2**, 476–483 (2000).
24. Zermati, Y. *et al.* Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. *Exp Hematol.* **28**, 885–894 (2000).

Supplementary information is linked to the online version of the paper at [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature).

**Acknowledgements** We thank C. Pouzet for her assistance in confocal analysis, F. Valensi and V. Asnafi for their assistance in cytological analysis, Y. Dumoz, A. Benachi and F. Audat for providing us with cord blood samples, U. Testa for the cDNAs of GATA-1 and poly(ADP-ribose) polymerase subcloned in PET21, and A. Benmerah for providing us with leptomycin B. This work was supported by grants from the Ligue nationale contre le cancer (LNC), the Fondation pour la recherche médicale (FRM), the Association pour la recherche sur le cancer (ARC), Cancéropole d'Ile de France, Fondation de France, Ministère de la recherche and AMGEN.

**Author information** Reprints and permissions information is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints). The authors declare no competing financial interests. Correspondence and requests for materials should be addressed to O.H. (heilm@necker.fr) or Y.Z. (zermati@igr.fr).

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

**Supplementary note****Hsp70 and Hsc70**

In humans, the inducible Hsp70 and the cognate Hsc70 proteins belong to a same family of proteins, and are encoded by distinct genes with some homologies (e.g. human *Hsc70* demonstrated up to 80% homologies with human *Hsp7A1*). In many cell types, Hsc70 is constitutively expressed and insensitive to stress, whereas Hsp70 is highly sensitive to stress. In *Xenopus Laevis* erythropoiesis, *hsp70* gene is constitutively transcribed at earlier stages of differentiation and heat shock-dependent at later stages (orthochromatic erythroblasts) (RS Winning and LW Browder, 128 (1):111-120, 1988 Dev Biol). To date, the expression and the role of Hsp70 are unknown in human erythropoiesis.

**Supplementary methods****Reagents**

Antibodies used included those targeting GATA-1 (N1 and C20 for immunoblot; N6 for confocal immunofluorescence microscopy and immunoprecipitation), Lamin B (M20), Hsp27 (M20) and Actin (I19) from Santa Cruz, Bel-X<sub>L</sub> (610211) from BD Biosciences, GPA (555569) from BD Pharmingen, Hsp70 (SPA-812), Hsp90 (SPA-830) and Hsc70 (SPA-815) from Stressgen Laboratories, activated caspase-3 from Cell signaling (#9661) for confocal microscopy and from Neomarkers (RB-1197) for immunoblotting. TO-PRO-3 (T-3605) and Orange Sytox (S11368) were from Molecular Probes, anti-rat-cy3 (712-166-153) and rabbit-cy5 (111-175-144) from Jackson ImmunoResearch, and rat immunoglobulin G (R 5005) from Sigma. Leptomycin B was a gift from Dr. A Benmerah, (Cochin Institute, Paris).

**In vitro generation of erythroid cells.**

Umbilical cord blood units from normal full-term deliveries were obtained, after informed mothers' consent, from the Obstetrics Unit of Hôpital Necker-Enfants Malades. CD36<sup>+</sup> erythroid progenitors, generated from 7 days IL-6 (100 ng/ml) +IL-3 (10 ng/ml) +SCF (100 ng/ml)-cultured CD34<sup>+</sup> progenitors isolated from cord blood (Miltenyi CD34 Progenitor Cell Isolation Kit), were cultured in the presence of IL-3 (10 ng/ml) + SCF (100 ng/ml) + Epo (2U/ml) in IMDM (Gibco cell culture) supplemented with 15% BIT 9500 (Stem Cell

Technologies) as described earlier [1]. After seven days of culture, apoptosis was induced by cytokines starvation (-Epo) during two (h2) or five (h5) hours.

#### **Immunoblot analyses.**

Cells were lysed in Laemmli buffer (whole cell lysates) or lysed 5 min on ice in a lysis buffer (0.2% NP40, 20mM Hepes pH7.9, 10mM KCl, 1mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM orthovanadate, 1mM PMSF, 1 mM DTT, and 10 $\mu$ g/ml of aprotinin/leupeptin/pepstatin) before centrifugation (2 min, 14,000 rpm) and supernatant collection (cytoplasmic extracts). Remaining pellets were lysed (350mM NaCl; 20% glycerol; 20mM Hepes pH 7.9; 10mM KCl; 1mM EDTA; 1mM orthovanadate, 1mM PMSF, 1mM DTT, and 10 $\mu$ g/ml of aprotinin/leupeptin/pepstatin), incubated for 30 min on ice and centrifuged for 20 min at 14,000 rpm before collecting the supernatant (nuclear extracts).

Whole lysates of  $5 \times 10^5$  cells or 50 $\mu$ g of proteins of nuclear or cytoplasmic extracts were resolved on 12% acrylamide gels and analysed by immunoblotting. Antigens were visualized by chemiluminescence using SuperSignal West Dura (Pierce).

#### **Generation of Hsp70 mutants**

Recombinant Hsp70 was generated using the pET-16b vector system (Novagen) with induction of protein expression and subsequent Ni<sup>2+</sup>-affinity-purification according to the manufacturer's protocol. Mutants of Hsp70 lacking either the ATP ( $\Delta$ ABD) or the peptide binding ( $\Delta$ PBD) domain were generated through restriction enzyme cleavage and subsequent ligation of full-length Hsp70 cDNA in pET-16b vector.  $\Delta$ ABD was generated through *Bgl*II digestion, creating an in-frame deletion of amino acids 119-426 comprising the ATPase domain.  $\Delta$ PBD was generated through *Sma*I digestion, creating an in-frame deletion of amino acids 437-617 comprising the peptide-binding domain. After purification, all proteins had their His-tag removed and were subsequently buffer-exchanged to D-PBS.

#### **Cell fractionation and immunoprecipitation**

Protein-protein interactions between GATA-1 and Hsp70 were determined by immunoprecipitation (IP) experiments. Cell fractionation was performed by incubating the cells in ice-cold buffer [250mM sucrose, 20mM HEPES, 10mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM orthovanadate, 1mM PMSF, 1mM DTT, and 10 $\mu$ g/ml of aprotinin, leupeptin, pepstatin (pH 7.4)], then by homogenization in a Potter-Thomas

homogenizer. Nuclei were pelleted via a 10 min, 3,200 rpm spin and the supernatant (cytoplasm) was collected [2]. Nuclei and whole cells (obtained from  $10^7$  cells) were lysed on ice in an IP buffer (1% NP40, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 65mM Tris Hcl pH 8, 50mM Hepes, 3% glycerol, 1mM orthovanadate, 1mM PMSF, 1mM DTT, and 10 $\mu$ g/ml of aprotinin, leupeptin, pepstatin) for 20 min, then spun at 14,000 rpm for 30 min and the supernatant was collected. Nuclei or whole cell lysates were incubated on ice for 1.5 hours with either an anti-GATA-1 (2  $\mu$ g) or and anti-Hsp70 (1/100) antibody in the presence of 50  $\mu$ l Protein G Microbeads (Miltenyi). The immune complex was immobilized to a  $\mu$ Column, isolated according to the manufacturer's instructions and analyzed by immunoblotting.

#### **In vitro GATA-1 cleavage assays**

GATA-1 and PARP cDNAs subcloned in PET21 plasmid in frame with amino-terminal T7 tag (GATA-1-PET, PARP-PET) (kindly provided by Dr De Maria and A Zeuner, Roma, Italy) were transcribed by using the In Vitro Translation Kit (L4610) from Promega in the presence of [ $^{35}$ S]-methionine (Amersham Biosciences). Two  $\mu$ l of GATA-1 or PARP translation reaction were preincubated with either human recombinant Hsp70 (NSP-555) (0 to 1 $\mu$ g) or Hsp90 (SPP-770) (1 $\mu$ g) from Stressgen Laboratories and Hsp70 mutants ( $\Delta$ ABD or peptide  $\Delta$ PBD) in a stoichiometric manner ( $\sim$ 1 $\mu$ g HSP70) for 40 minutes at room temperature in buffer (25mM Hepes, 0.1% Chaps, 5mM DTT, 1mM EDTA, PH7.5) in a final volume of 15 $\mu$ l, then incubated for 1h at 37 $^{\circ}$ C with 70ng recombinant caspase-3 in a final buffer volume of 25 $\mu$ l. Reaction products were run on 10% acrylamide gel, and GATA-1 and PARP products were analyzed by autoradiography of dried gel.

#### **Hsp70 siRNAs.**

All siRNAs were obtained from Qiagen, and included a non-silencing Alexa Fluor 488 labeled siRNA, a specific siRNA for inducible Hsp70 (CTG GCC TTT CCA GGT GAT CAA); a scramble siRNA (CAG TAA TTG CAC CCG TCG TGT). Stealth siRNA for Hsp70 (ACU UCG UGG AGG AGU UCA AGA GAA A) and a control stealth siRNA (Block-iT, manufacturer's confidential sequence) were obtained from Invitrogen, life technologies.

#### **Transfection of HeLa cells.**

HeLa cells were infected with viral particles containing GFP-tagged GATA-1 vector [3] and GFP-positive cells were selected by cell sorting using a Coulter EPICS EPS (Beckman

Coulter). Twenty-four hours after seeding, these cells were transfected with either wild type or mutated Hsp70 constructs (subcloned in pcDNA3 vector) using the Superfect transfection reagent (Qiagen, Valencia, CA) following the manufacturer's instructions, and analyzed 48 hours later.

#### **Transfection of hematopoietic progenitors.**

$2 \times 10^6$  of five days IL-6 (100 ng/ml) +IL-3 (10 ng/ml) +SCF (100 ng/ml)-cultured CD34<sup>+</sup> cells were transfected in a Human CD34 Cell Nucleofector buffer with 10 $\mu$ g of siRNA using a Nucleofector (Amaxa Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Cells were then cultured for 1 day with IL-6+IL-3+SCF. Thereafter, dead cells were removed with Dead Cell Removal Kit (Miltenyi). Transfection efficiency of the non-silencing Alexa Fluor 488 labeled siRNA was examined by FACS analysis (>90% of viable cells) (data not shown). Remaining alive cells were cultured with Epo+IL-3 in serum-free medium.

#### **Production of retroviral particles and infection of haematopoietic progenitors.**

Wild-type (WT) and mutated GATA-1 ( $\mu$ GATA-1) cloned in PINCO vector [3] were transfected in the amphotropic packaging cell-line PLAT-A (kindly provided by Pr Toshio Kitamura, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan) and supernatants containing viral particles were collected 48 h after transfection. CD34<sup>+</sup> cells exposed to SCF (100 ng/ml), IL-3 (60 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml) and TPO (100 ng/ml) were daily infected during 72h, after 24h of culture. After three additional days of culture without TPO, siRNA were transfected 24h later after last infection. Finally, cells were grown in serum-free medium supplemented with IL-3 (0.01 U/ml) and Epo (3 U/ml). GFP-positive cells were sorted 24 h after siRNA transfection using a FACS VANTAGE cell sorter (Becton Dickinson).

#### **Cell permeabilization and labelling for Fluorescence microscopy**

$5 \times 10^4$  cells were washed, spin on slides, acetone fixated, hydrated with cold 1X PBS/1% BSA for 30 minutes, treated with formaldehyde (Sigma) for 15 minutes, then with methanol (Prolabo) for 10 minutes at room temperature. Cells were then permeabilized with 1X PBS/0.2% Triton X100 (Sigma) for 10 minutes at 4°C, washed with 1X PBS/1% BSA and incubated in 3% BSA for 30 min. They were then sequentially incubated with antibodies diluted in 1XPBS/1% BSA/0.1% Tween (Sigma): anti-GATA-1 overnight at 4°C; then anti-rat-Cy3 for 45 minutes at room temperature, then rabbit anti-Hsp70 or anti-caspase-3 for 1 hour at room temperature, then anti-rabbit Cy5 for 45 minutes at room temperature. Nuclei

were stained with TO-PRO-3, and slides were examined with a confocal laser microscope (LSM 510 Carl Zeiss).

Fresh normal bone marrow cells were separated by centrifugation on Ficoll, spin on slides and fixed with acetone. Permeabilization and labelling with anti-GATA-1 and anti-Hsp70 antibodies was performed as above. Then, the cells were incubated for 1 hour at room temperature with anti-GPA antibody and DNA was stained with Orange Sytox for 5 min at room temperature before confocal laser microscope observation.

#### Supplementary figure legends

**Figure 1S. Role of caspases in erythropoiesis regulation.** A- Caspase-3 is required for terminal erythroid maturation. Erythropoiesis is a multistep process that involves the sequential formation of proerythroblasts (ProE) and basophilic (Baso), polychromatic (Poly) and orthochromatic (Ortho) erythroblasts leading to red cells (RC) production. During maturation of erythroblasts, caspase-3 is activated and its inhibition results in erythroid differentiation arrest at the proerythroblast stage. B- Patterns of caspase-3-induced proteolysis during apoptosis and differentiation of erythroid cells. During both apoptosis and differentiation, caspase-3 cleaves several targets involved in nucleus and chromatin condensation. In contrast, GATA-1 is protected from caspase-3 proteolysis during erythroid differentiation. GPA (glycophorin A), Hb (hemoglobin), Epo (erythropoietin).

**Figure 2S. Caspase 3 is the main caspase activated in the nucleus of erythroblast during erythroid differentiation.**

Immunoblot analysis of caspases 3, 6, 7, 8, 9 activation in nucleus and cytoplasm extracts of CD36<sup>+</sup> cells cultured for 7 days in the presence of Epo+IL-3+SCF and then Epo-starved (-Epo) or not (+Epo) for 5 hours. Cleavage fragments of caspase-3, suggesting activation, and the proform of caspase-7 (without cleavage fragments) were detected in the nucleus. Caspase 6, or caspase 8 were not identified in the nucleus.

**Figure 3S. Nuclear colocalization of Hsp70 and GATA-1 in GPA positive cells from fresh normal human bone-marrow.**

Expression analysis by confocal microscopy in normal fresh bone-marrow cells of a- GPA (blue), GATA-1 (red) and Hsp70 (green). White hue shows GATA-1 and Hsp70

colocalization. **b-** GPA (blue), Hsp70 (green), DNA (yellow). **c-** Morphologic analysis after May Grunwald staining (MGG).

**Figure 4S. Ability of Hsp70 interaction with GATA-1 is not affected by Epo starvation.**

CD36<sup>+</sup> cells cultured for 7 days in the presence of Epo+IL-3+SCF and then Epo-starved (-Epo) or not (+Epo) for 5 hours. Nuclear proteins were immunoprecipitated using an anti-GATA-1 antibody, then immunoblotted for indicated proteins. A 5-fold increase in the input of nuclear extract from cells starved of Epo (h5x5) is compared to non starved cells (d7).

**Figure 5S. Before caspase activation, decrease in nuclear Hsp70 content is not associated with GATA-1 degradation.**

After 5 days of culture in the presence of IL-3+IL-6+SCF, CD34<sup>+</sup> progenitors were transfected with 10 µg of a siRNA targeting Hsp70 (siRNA Hsp70) or a scrambled siRNA (siRNA control). Two days after transfection, cells were diluted to 4.10<sup>5</sup> cells/ml, and then cultured in the presence Epo+IL-3 for 2 days. Immunoblot analysis of indicated proteins in nuclear and cytoplasmic extracts is shown (see also figure 3b, day 2).

**Figure 6S. Decreased Hsp70 content induces death of erythroblasts undergoing differentiation.**

After 5 days of culture in the presence of IL-3+IL-6+SCF, CD34<sup>+</sup> progenitors were transfected with 10 µg of an antisense targeting Hsp70 or a control antisense. Two days after transfection, cells were diluted to 4.10<sup>5</sup> cells/ml, then cultured in the presence Epo+IL-3 for indicated times (days). **a-** Growth curves. **b-** Percentage of cell death. **c-** Percentage of mature cells. **d-** Percentage of mature cells exhibiting morphological features of apoptosis. Results are the mean ± SD of 3 independent experiments. \* p < 0.05. **e-** Immunoblot analysis of Hsp70 in whole cell lysate at day 2 of culture (d2). The non-inducible Hsc70 is used as loading control.

**Figure 7S. Decreased Hsp70 content induces death of erythroblasts undergoing differentiation even in the presence of SCF.**

After 5 days of culture in the presence of IL-3+IL-6+SCF, CD34<sup>+</sup> progenitors were transfected with 10 µg of a siRNA stealth targeting Hsp70 or a control siRNA stealth. Two days after transfection, cells were diluted to 4.10<sup>5</sup> cells/ml, then cultured in the presence Epo+IL-3 and in the presence of SCF for indicated times (days). **a-** Growth curves. **b-**

Percentage of cell death. **c-** Percentage of mature cells. **d-** Percentage of mature cells exhibiting morphological features of apoptosis. Results are the mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments. \*  $p < 0.05$ . **e-** Immunoblot analysis of Hsp70 in whole cell lysate at day 2 of culture (d2). The non-inducible Hsc70 is used as loading control.

**Figure 8S. Model of GATA-1 protection from caspase-3-induced cleavage by Hsp70 during erythroid differentiation.**

#### Supplementary references

1. Zermati, Y., et al., *Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors*. *Exp Hematol*, 2000. **28**(8): p. 885-94.
2. Gurbuxani, S., et al., *Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells*. *Oncogene*, 2001. **20**(51): p. 7478-85
3. De Maria, R., et al., *Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1*. *Nature*, 1999. **401**(6752): p. 489-93

Fig 1S

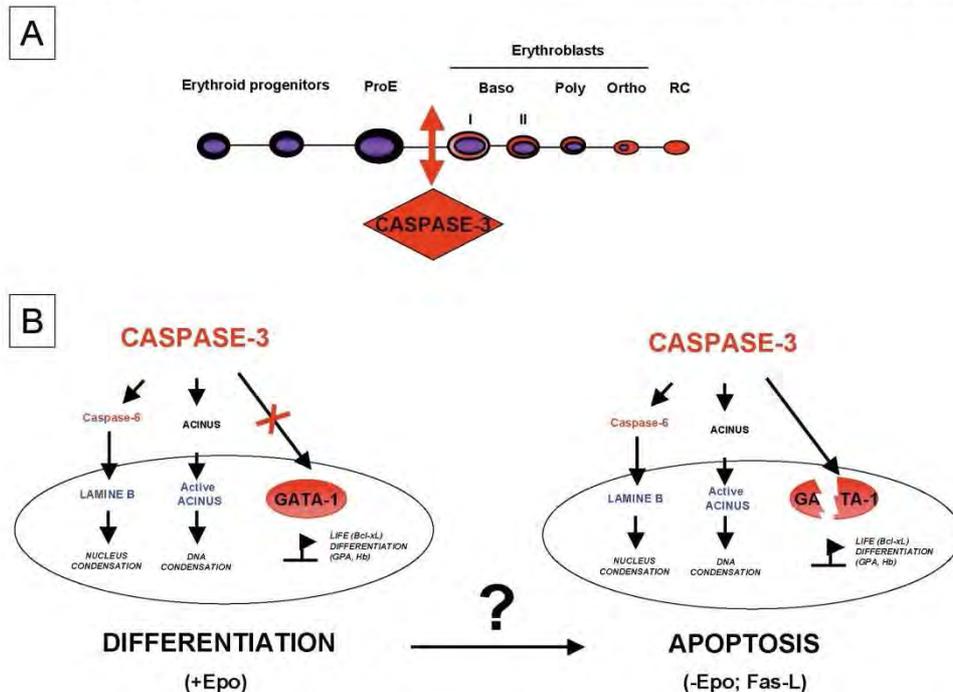


Fig 2S

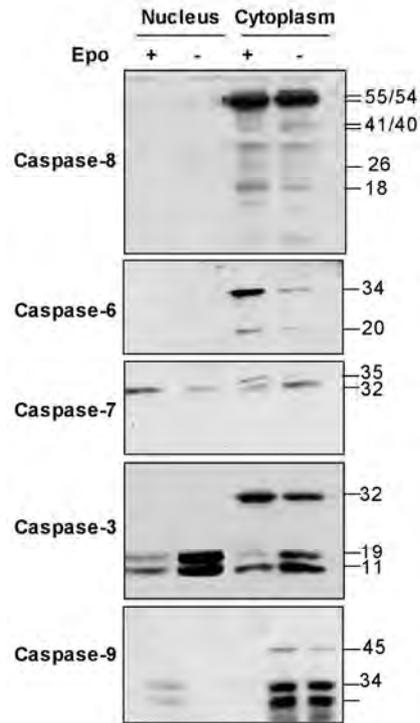


Fig 3S

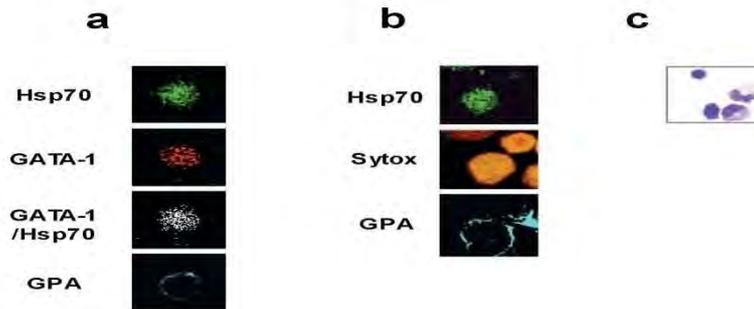


Fig 4S

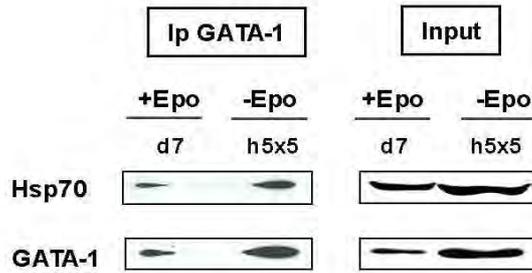


Fig 5S

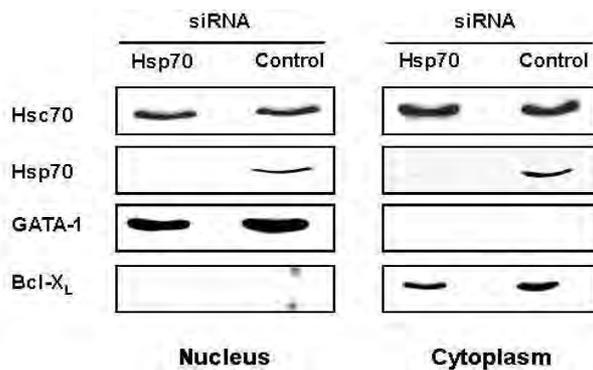


Fig 6S

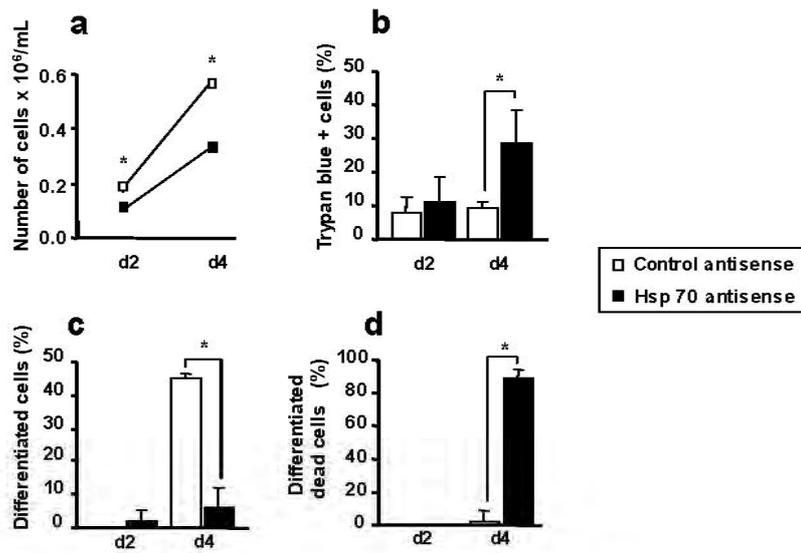


Fig 7S

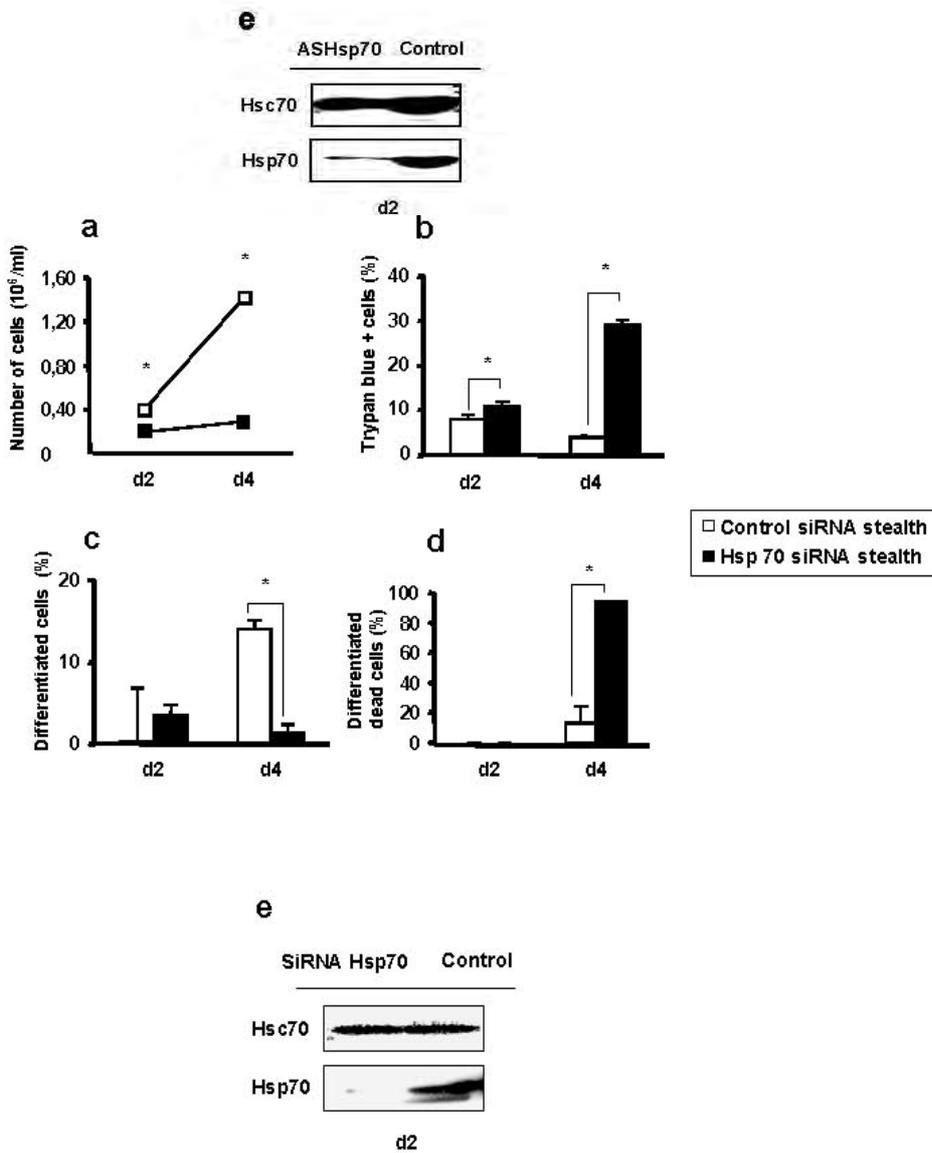
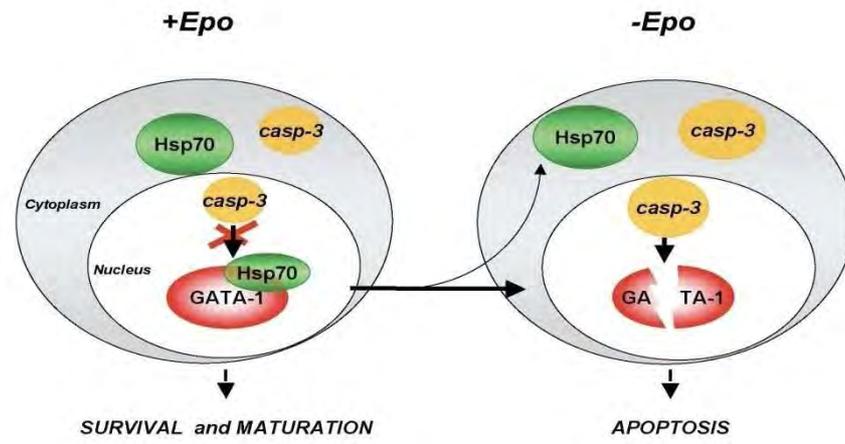


Fig 8S



## **Prevention of Mantle Lymphoma Tumor Establishment by Routing Transferrin Receptor toward Lysosomal Compartments**

Yves Lepelletier, Valérie Camara-Clayette, Hulin Jin, Aurélie Hermant, Séverine Coulon, Michaël Dussiot, Michelle Arcos-Fajardo, Cédric Baude, Danielle Canionni, Richard Delarue, Nicole Brousse, Philippe Benaroch, Marc Benhamou, Vincent Ribrag, Renato C. Monteiro, Ivan C. Moura, et Olivier Hermine.

**Cancer Research** 2007; 67: (3). February 1, 2007

### **Contexte du travail:**

Le RTf permet l'entrée cellulaire du fer associé à la transferrine via un processus d'endocytose. Ce processus est le principal mécanisme d'entrée du fer dans la cellule. Différentes études montrent que les cellules tumorales à haute capacité proliférative expriment plus fortement le RTf et sont plus sensibles à la privation en fer que leurs homologues non tumoraux. C'est pourquoi le RTf constitue une cible attractive en thérapie anti-tumorale. Le laboratoire a développé un anticorps anti-RTf et étudié son efficacité dans la leucémie/ lymphome T de l'adulte liée au virus HTLV1 (ATL){Moura, 2004 #307}. Dans cette étude, l'efficacité d'A24 est testée dans les lymphomes du manteau, qui sont des pathologies agressives de mauvais pronostic

### **Résultats:**

Dans cette étude, l'effet de l'anticorps anti-RTf1 A24 a été évalué dans le lymphome du manteau. Nous avons montré que les cellules du lymphome du manteau expriment d'autant plus le RTf que la tumeur est agressive. Dans un modèle de xénogreffe chez la souris, par implantation sous-cutanée de cellules lymphomateuses, A24 a montré une efficacité importante en prévention primaire puisqu'une seule injection de cet anticorps (40 mg/kg) prévient complètement l'apparition de la tumeur. Chez les souris présentant une tumeur préalablement installée, l'administration d'A24 réduit de façon drastique la croissance tumorale, ce qui est associé à une augmentation significative de la survie des souris. La fixation d'A24 sur le RTf induit une endocytose du récepteur vers les compartiments lysosomiaux où celui-ci est dégradé. Les cellules traitées par A24 présentent ainsi une diminution drastique du nombre de récepteurs à la surface. En conséquence, les cellules ont une réduction très importante de leur capture du fer. A24 pourrait donc être un agent thérapeutique prometteur dans

les lymphomes du manteau, seul ou associé à d'autres anticorps monoclonaux (rituximab) et/ou aux chimiothérapies conventionnelles.

**Perspectives:**

Les propriétés anti-tumorales d'A24 doivent être évaluées sur d'autres hémopathies et éventuellement sur les cellules souches leucémiques qui sont des cellules difficilement atteinte par les thérapies conventionnelles. D'autre part, des tests de toxicité ont été effectués chez le singe montrant une innocuité du produit notamment au niveau médullaire. Enfin, l'humanisation de cet anticorps est en cours de développement. L'aboutissement de ces études devrait nous fournir des bases solides pour la mise en œuvre d'essais cliniques chez l'homme en monothérapie ou en association à des chimiothérapies conventionnelles dans un futur proche.

## Prevention of Mantle Lymphoma Tumor Establishment by Routing Transferrin Receptor toward Lysosomal Compartments

Yves Lepelletier,<sup>1</sup> Valérie Camara-Clayette,<sup>6</sup> Hulin Jin,<sup>2</sup> Aurélie Hermant,<sup>1</sup> Séverine Coulon,<sup>1</sup> Michaël Dussiot,<sup>1</sup> Michelle Arcos-Fajardo,<sup>3</sup> Cédric Baude,<sup>1</sup> Danielle Canionni,<sup>4</sup> Richard Delarue,<sup>5</sup> Nicole Brousse,<sup>1</sup> Philippe Benaroch,<sup>2</sup> Marc Benhamou,<sup>3</sup> Vincent Ribrag,<sup>6</sup> Renato C. Monteiro,<sup>3</sup> Ivan C. Moura,<sup>1,3</sup> and Olivier Hermine<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Centre National de la Recherche Scientifique UMR 8147, Université Paris V, Hôpital Necker; <sup>2</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U520, Institut Curie; <sup>3</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U699, Faculté de Médecine Xavier Bichat; <sup>4</sup>Service d'Anatomo-pathologie and <sup>5</sup>Service d'Hématologie, Hôpital Necker, Paris, France; and <sup>6</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

### Abstract

Mantle cell lymphoma (MCL) is one of the most frequent of the newly recognized non-Hodgkin's lymphomas. The major problem of MCL therapy is the occurrence of relapse and subsequent resistance to chemotherapy and immunotherapy in virtually all cases. Here, we show that one injection of anti-human transferrin receptor (TfR) monoclonal antibody A24 totally prevented xenografted MCL tumor establishment in nude mice. It also delayed and inhibited tumor progression of established tumors, prolonging mice survival. *In vitro*, A24 induced up to 85% reduction of MCL cell proliferation (IC<sub>50</sub> = 3.75 nmol/L) independently of antibody aggregation, complement-dependent or antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. A24 induced MCL cell apoptosis through caspase-3 and caspase-9 activation, either alone or synergistically with chemotherapeutic agents. A24 induced TfR endocytosis via the clathrin adaptor protein-2 complex pathway followed by transport to lysosomal compartments. Therefore, A24-based therapies alone or in association with classic chemotherapies could provide a new alternative strategy against MCL, particularly in relapsing cases. [Cancer Res 2007;67(3):1145–54]

### Introduction

Mantle cell lymphoma (MCL) is a distinctive non-Hodgkin's lymphoma subtype (1) that is well recognized by both European-American classification of lymphoid neoplasms (REAL; ref. 1) and WHO (2). Despite its morphologic heterogeneity, MCL is defined as a lymphoma of small lymphocytes with a characteristic phenotype (CD5<sup>+</sup>, CD23<sup>-</sup>, CD10<sup>-</sup>, IgM<sup>+</sup>, and IgD<sup>+</sup>) associated with a juxtaposition of the *BCL1* gene on chromosome 11 with the immunoglobulin heavy-chain gene on chromosome 14, the so-called t(11, 14) (q23, q32) translocation. This juxtaposition mediates the overexpression of the *cyclin D1* gene (3) that contributes to the establishment and development of this malignancy. MCL is an aggressive disease associated with poor prognosis and responsiveness to conventional chemotherapy with a 3- to 4-year median survival (4). First-line intensive high-dose chemotherapy, including

high-dose cytosine arabinoside (ara-C) regimen, may induce complete remission in a significant number of cases. High-dose chemotherapy has improved significantly survival and event-free survival. However, the probability of cure remains low since relapse occurred in virtually all cases (5, 6). Novel therapeutic approaches, including monoclonal antibody (mAb)-based therapy (such as anti-CD20, rituximab), significantly increase response rates, but the mean survival is not drastically improved (7–9). Recent trials with the proteasome inhibitor PS341 (bortezomib) have shown a good response rate in relapsing MCL patients (10). However, the duration of response is not yet known, and relapses occur on therapy. Therefore, new therapeutic agents are needed to achieve efficient treatment of MCL, particularly to prevent relapse, which is the major challenge of this still incurable disease.

Transferrin (Tf) is the major serum iron transporter. Iron plays a central role in a large number of essential cellular functions, such as oxygen transport, mitochondrial energy metabolism, and electron transport. Rapidly growing tumor cells, but not their normal counterparts, highly express Tf receptors (TfR) and require transferrin for cell growth and survival. TfR promotes iron uptake through endocytosis of Fe-loaded holotransferrin molecules and are constantly recycled to the cell surface (11). Fe-Tf-induced TfR endocytosis is dependent on clathrin-coated pits. In these membrane microdomains, several accessory proteins have been implicated in Fe-Tf-dependent receptor endocytosis. Among clathrin-associated proteins, the adaptor protein-2 (AP-2) complex is, at least in part, responsible for TfR sorting to the endocytic compartment (12, 13). In this regard, AP-2 depletion in HeLa cells induces TfR up-regulation due to endocytosis impairment (14).

We recently reported the ability of a new anti-TfR mAb (A24) to specifically target highly proliferative cells (15). Although non-blastic MCL is considered to some extent as an indolent lymphoma, cells from MCL patients are characterized by their profile of proliferation gene expression (16). Thus, we hypothesized that MCL may highly express TfR and, as such, might be a good candidate to be targeted by A24 antibody *in vitro* and *in vivo*. Herein, we show that TfR is highly expressed on MCL cells, and that A24 totally prevented tumor establishment and decreased the growth rate of pre-established tumors in athymic nude mice. *In vitro*, A24 blocked proliferation of these malignant cells by inducing cell apoptosis through caspase-3 and caspase-9 activation. A24 induced an AP-2-dependent TfR endocytosis, leading to its translocation to lysosomal compartments. These observations open new avenues in the treatment of this aggressive disease, particularly in its relapsing stage.

**Requests for reprints:** Olivier Hermine, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 8147, Hôpital Necker, 161 rue de Sèvres, 75015 Paris, France. Phone: 33-1-44-49-53-86; Fax: 33-1-44-49-06-76; E-mail: hermine@necker.fr or Ivan C. Moura, INSERM U699, Immunopathologie rénale, récepteurs et inflammation, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16 Rue Henri Huchard, F-75870 Paris Cedex 18, France. Phone: 33-1-44-85-62-61; Fax: 33-1-44-85-62-60; E-mail: moura72@gmail.com.

©2007 American Association for Cancer Research.  
doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1962

## Materials and Methods

**Cells, antibodies, and chemical agents.** Granta-519, NCEB-1, REC-1, JVM-2 (17), UPN1, and UPN2 (18) MCL cell lines were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mmol/L glutamine, and 50 µg/mL penicillin/streptomycin, at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Anti-CD20-FITC, anti-Tfr-phycoerythrin (PE), irrelevant mouse IgG-FITC, and mouse IgG-PE isotype controls were all from Immunotech (Marseille, France). Chemotherapeutic agents Adriblastin (Pharmacia, Brussels, Belgium), ara-C (Pharmacia, Belgium), etoposide (VP-16; Sigma, Lyon, France) were used at 0.1 to 1,000 ng/mL. Blocking antibodies rituximab (anti-CD20; Roche Diagnostic, Meylan, France) and A24 anti-human Tfr (15) were used.

**Patient biopsies and immunostaining of sections.** Lymph node biopsies were obtained from the Anatomic-pathology Department at the Necker Hospital after agreement of the Necker Hospital ethic committee and after patients' written informed consent. Tumor cells were isolated from ascite from a patient with peritoneal involvement by MCL cells (CD5<sup>+</sup>, CD23<sup>-</sup>, FMC7<sup>+</sup>, cyclin D1<sup>+</sup>, and IgH-bcl1<sup>+</sup>; data not shown). Biopsies were from diffuse large B cell lymphoma (DLBCL), small lymphocytic lymphoma (SLL), follicular lymphoma, and MCL patients according to histologic, morphologic, and immunophenotypic (CD5<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, and cyclin D1<sup>+</sup>) criteria. Cryostat sections from patients' biopsies were blocked in TBS/2% nonfat milk, stained with 10 µg/mL A24 or anti-Ki-67 in PBS/0.5% bovine serum albumin, and incubated in a humidified chamber for 30 min at room temperature. The primary antibody was visualized using a relevant secondary antibody. The DAKO LSAB system was used for the staining procedure of acetone-fixed cryostat sections according to the manufacturer's instructions.

**Gene knockdown.** A strategy using pTRIP.CMV.GFP lentivirus vector for short hairpin RNA (shRNA) delivery was chosen. The lentivirus vector was kindly provided by Dr. Pierre Charneau (19). For the construction of pTRIP-AP-1-γ adaptin or pTRIP-AP-2-μ2, a DNA fragment containing H1 promoter and AP-1 or AP-2 shRNA sequence was generated by *SpeI/SalI* double digestion of pSUPER-AP-1-γ adaptin or AP-2-μ2 plasmids (20) and was subcloned into pTRIP.CMV.GFP at the *NheI/SalI* cloning site, which is located within the 3' long terminal repeat of the vector.

For virus production, the 293T human kidney cells ( $2 \times 10^6$ ) were seeded on 10-cm plates and transfected the following day with 15 µg of packaging plasmid pCMVDR8.71 (21), 20 µg of the various pTRIP-CMV-GFP plasmid constructs (AP-1-γ adaptin, AP-2-μ2, or control), and 5 µg of VSV-G-coding plasmid pHCMVG (ref. 22; kindly provided by Prof. Didier Trono), using calcium phosphate DNA precipitation method. Eight hours after transfection, the medium was replaced, and after 24 h, cells were placed at 32°C to increase viral titer. Forty-eight hours after transfection, the 0.45-µm filtered supernatant was collected and conserved at -80°C before use for infection.

The DG-75 human B cell line (23), kindly provided by Prof. Martin Rowe, was then infected with the various lentivirus. Cells were cultured in RPMI 1640 containing 10% FCS, 2 mmol/L L-glutamine, 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Life Technologies, Cergy Pontoise, France). Five hundred thousand cells were resuspended in 200 µL culture medium and used for each infection. The viral supernatant was added to the cells. After 2 h at 37°C, 2 mL of fresh culture medium were added, and the cells were returned to 37°C culture until analysis.

**Cell proliferation assay.** MCL cells were resuspended in RPMI 1640 with 10% FCS and added in triplicate at  $2.5 \times 10^4$  per well in 96-well tissue culture plates (Falcon, Oxnard, CA). Proliferation was measured over 18 h, using pulses of 1 µCi/well (0.037 MBq/well) [<sup>3</sup>H]thymidine (Amersham, Saclay, France). Cells were harvested with a 96-well Harvester (Pharmacia) and collected on filters (Pharmacia), and incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine was measured with a β-plate microscintillation counter (LKB, Pharmacia, France).

**Cell cycle analysis.** Cells were cultured for 24, 48, or 72 h in the presence of different chemotherapeutic agents, each used at its IC<sub>50</sub> concentration. Cells were then harvested and centrifuged, resuspended in a propidium iodide buffer (0.1% of NaCl, 0.1% Triton X-100, 50 µg/mL propidium iodide), and incubated 15 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of

cold PBS. Cell cycles were then analyzed using a flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson, Le pont de Claix, France).

**Apoptosis assay.** Phosphatidylserine externalization was evaluated by Annexin V (Becton Dickinson) binding as previously described (15). Apoptotic cells were visualized by Annexin V/propidium iodide double staining. For activated caspase-3 detection, cells were cultured in the presence of A24, ara-C, or medium. Cells were then harvested, washed twice in PBS, and fixed in 4% paraformaldehyde for 5 min at 4°C. After fixation, cells were stained with anti-caspase-3 antibody or control isotype during 30 min in the presence of 0.1% saponin, 0.4% bovine serum albumin in PBS. Caspase-3 staining was revealed using a donkey anti-mouse IgG-PE.

**Western blot analysis.** Treated and untreated MCL cells were lysed using Laemmli sample buffer [62 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS, 5% (v/v) β-mercaptoethanol] and boiled for 3 min. Protein content was measured using the Bio-Rad Protein assay, and 30 µg per lane were loaded on a 12% SDS-PAGE gel. Proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, Belgium) and were detected with polyclonal rabbit antibody against cleaved caspase-3, cleaved caspase-9, p27<sup>kip</sup>, cyclin D1, γ-adaptin, μ2, tubulin, or actin (Tebu, Le Perray-en-Yvelines, France) followed by a secondary antibody-horseradish peroxidase conjugate (Pierce, Brebières, France) and visualized by chemoluminescence with the ECL kit (Pierce).

**Tfr internalization.** Both EBV<sup>-</sup> and EBV<sup>+</sup> MCL cells were incubated at 4°C with A24 or rituximab for 30 min, washed, and plated at 37°C in culture medium for various time lengths (30 min to 72 h). Cells were then harvested and stained with a mAb against Tfr or against CD20 or with control isotype (all from Becton Dickinson) and analyzed by flow cytometry.

**Confocal microscopy.** MCL cells were incubated with A24 and plated in culture medium at 37°C for 15 min to 1 h. LysoTracker experiments were done according to the manufacturer's instructions (Molecular Probes, Cergy Pontoise, France). Controls for cell surface labeling in the absence of receptor internalization were done at 4°C. Cells were harvested, washed, and plated on poly-L-lysine (Sigma, St. Louis, MO)-coated slides for 1 h at 4°C. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde, quenched with 0.1 mol/L glycine, and permeabilized with 0.5% saponin. To detect A24, slides were incubated with a polyclonal goat anti-mouse IgG conjugated to CY5 (Jackson ImmunoResearch, Villepinte, France). Lysosomal compartments were identified using monoclonal anti-LAMP-1 (CD107a-FITC) and anti-LAMP-2 (CD107b-PE) antibodies (Becton Dickinson). Mounted slides were examined with a confocal laser microscope (LSM 510, Carl Zeiss, Jena, Germany).

**Human tumor xenografts.** For prevention of tumor establishment,  $5 \times 10^6$  UPN1 cells mixed with Matrigel (1:1, v/v) were injected as s.c. xenografts in 30 female athymic (NCR nu/nu, Taconic, Germantown, NY) nude mice sublethally irradiated (5 Gy). Mice were then i.v. injected with A24 (40 mg/kg) or PBS as a vehicle control. For treatment of established tumors, 19 mice bearing tumors, reaching a diameter of about 5 mm, were injected i.v. with A24 (40 mg/kg) or PBS. Tumor growth was measured thrice a week. Tumor volume was calculated using the following equation:  $V = L \times (S^2)\pi/6$ , where  $L$  is the longer, and  $S$  is the shorter, of the two dimensions. Tumor volumes were then expressed as a percentage of the volume at the start of treatment. The effect of the drug was determined by the growth delay as previously described (24).

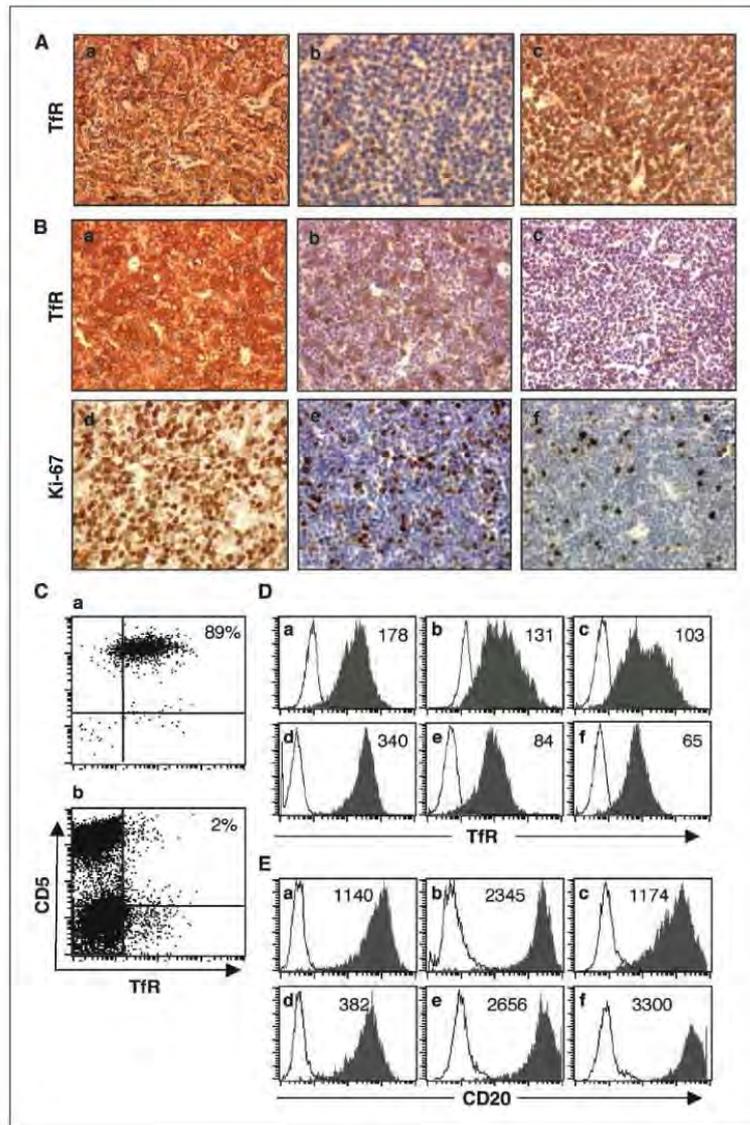
## Results

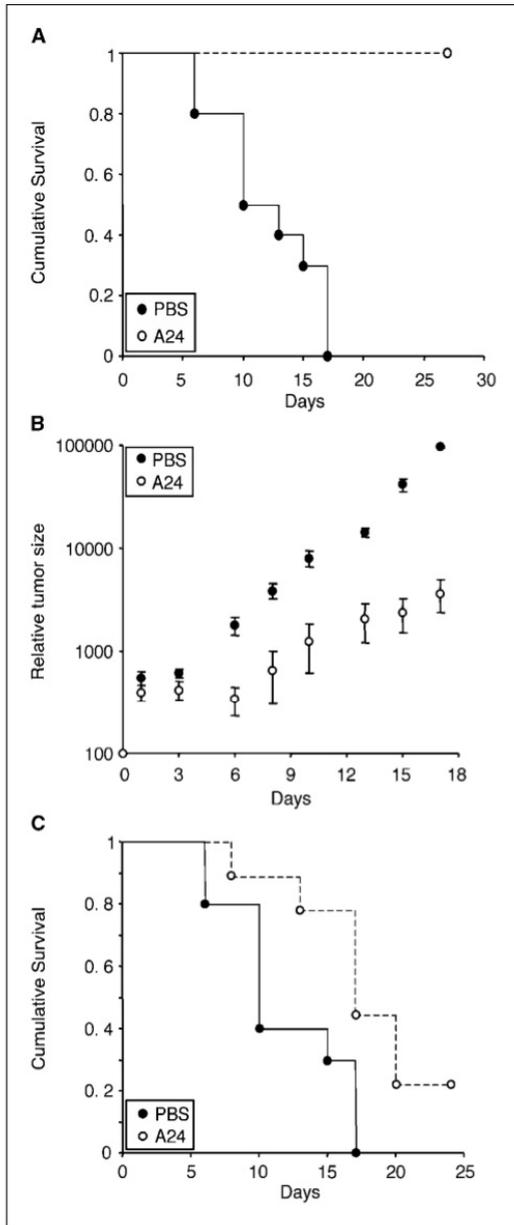
**Tfr is overexpressed in MCL cells infiltrating human lymph nodes and in MCL cell lines.** Tfr expression is enhanced in highly proliferative tumor cells (25). It has been previously shown that Tfr is expressed in non-Hodgkin's lymphomas (26). However, there is no extensive data about *in situ* Tfr expression on different histologic subtypes of B cell non-Hodgkin's lymphomas, including MCL. Although most MCL are closely related to low-grade lymphomas, they are characterized by overexpression of the *cyclin D1* gene. Therefore, Tfr expression was compared between MCL and other B cell non-Hodgkin's lymphomas. Two main groups of

indolent lymphomas (i.e., SLL and follicular lymphoma low-grade lymphoma) and the main subtype of aggressive lymphomas (i.e., DLBCL), were studied. Among non-Hodgkin's lymphomas, TfR was highly expressed in all DLBCL (five of five biopsies; Fig. 1A, a). By contrast, SLL (five biopsies) and follicular lymphoma (five biopsies) poorly expressed TfR (Fig. 1A, b; data not shown). Interestingly, we found TfR expression in five of five biopsies derived from MCL patients (Fig. 1A, c). However, the number of TfR-positive cells and the intensity of TfR labeling were variable

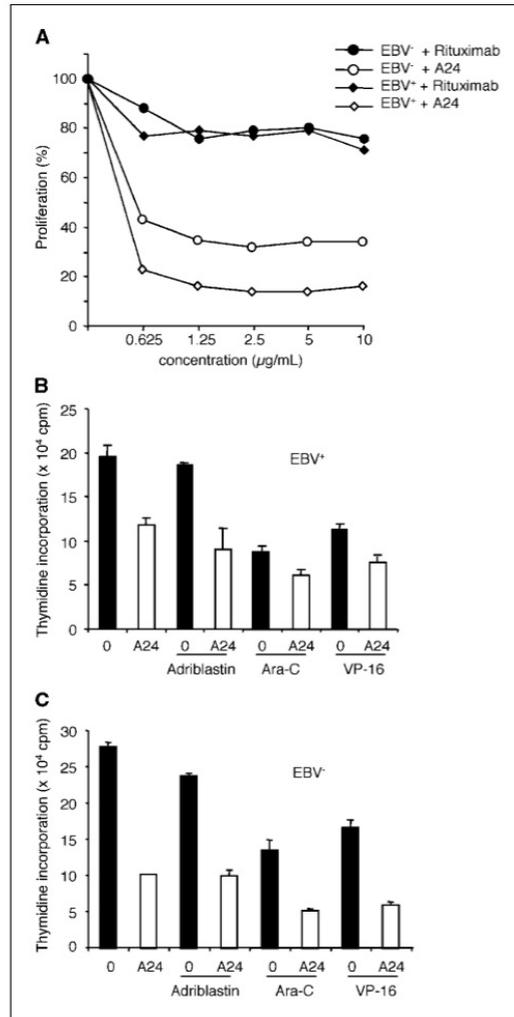
among MCL biopsies. To examine if these differences in TfR expression were correlated to tumor proliferation status, we compared TfR expression with that of the Ki-67 proliferation marker. Figure 1B shows immunohistochemical analysis of high (a and d), medium (b and e), and low (c and f) mitotic activity. The levels of TfR and Ki-67 expression were correlated because TfR expression was high in Ki-67<sup>high</sup> biopsies and weak when low numbers of Ki-67-positive cells were detected. As reported earlier (27), TfR expression was also observed in reactive activated T cells

**Figure 1.** TfR expression on MCL. A, immunohistochemical analysis of TfR expression with A24 in DLBCL (a), SLL (b), and MCL B-cell (c). Magnification,  $\times 400$ . B, TfR is correlated with Ki-67 expression in MCL. Immunohistochemical analysis of TfR and Ki-67 expression on lymph nodes biopsies from MCL patients. Ki-67 high (d), medium (e), and low (f) correlates with TfR staining (a-c). C, TfR is highly expressed in MCL patient cells (a) but not on healthy individuals (b). TfR and CD5 expression on MCL cells (CD5<sup>+</sup>, CD23<sup>-</sup>, FMC7<sup>+</sup>, cyclin D1<sup>+</sup>, and IgH-bcl1<sup>+</sup>) infiltrating ascite. D and E, enhanced TfR and CD20 expression in established-MCL lines. MCL cells [NCEB-1 (a), JVM-2 (b), UPN2 (c), UPN1 (d), REC-1 (e), and Granta-519 (f)] were stained with monoclonal antibodies (closed histograms) against TfR (D) or CD20 (E) and with control isotype (open histograms). Numbers indicate the median fluorescence intensity values.





**Figure 2.** *In vivo* action of A24 in nude mice bearing xenografted tumors. **A**, A24 treatment prevents tumor establishment. Kaplan-Meier survival curves of sublethally irradiated nude mice s.c. injected with UPN1 cells and treated with A24 (40 mg/kg) or vehicle (PBS). **B**, A24 treatment delayed tumor growth. Growth curves from pre-established UPN1 tumors (~5 mm) in mice treated with A24 or vehicle (PBS). Points, mean; bars, SE. **C**, A24 enhances the survival of mice bearing MCL tumors. Kaplan-Meier survival curves of mice bearing pre-established UPN1 tumors treated with A24 or vehicle (PBS).



**Figure 3.** A24 blocks MCL cell proliferation and synergizes with anti-MCL chemotherapeutic agents. **A**, A24 inhibits MCL tumor cell proliferation. Both EBV<sup>+</sup> and EBV<sup>-</sup> MCL cell lines were cultured for 72 h in the presence of rituximab (0.625–10 µg/mL) or A24 (0.625–10 µg/mL). Cells were then pulsed for 16 h with [<sup>3</sup>H]thymidine and harvested to measure radioactive incorporation. **B** and **C**, A24 can act in synergy with MCL chemotherapies. EBV<sup>+</sup> and EBV<sup>-</sup> MCL were incubated with or without A24 (0.625 µg/mL) in the presence of chemotherapeutic agents, such as ara-C (1 ng/mL), VP-16 (100 ng/mL), and Adriablastin (4 ng/mL) for 72 h to determine the potential synergistic effect of these agents with A24. Cell proliferation was then evaluated by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation. Columns, mean of one representative experiment out of three separate experiments; bars, SE.

present in the lymph node (data not shown). We next assessed the level of TfR expression in MCL cells from patients. Ascite infiltrated by MCL (CD5<sup>+</sup>) cells were highly positives (89%) for TfR compared with control cells (Fig. 1C). These data emphasize the peculiar

proliferative characteristics of MCL in comparison with other indolent lymphomas.

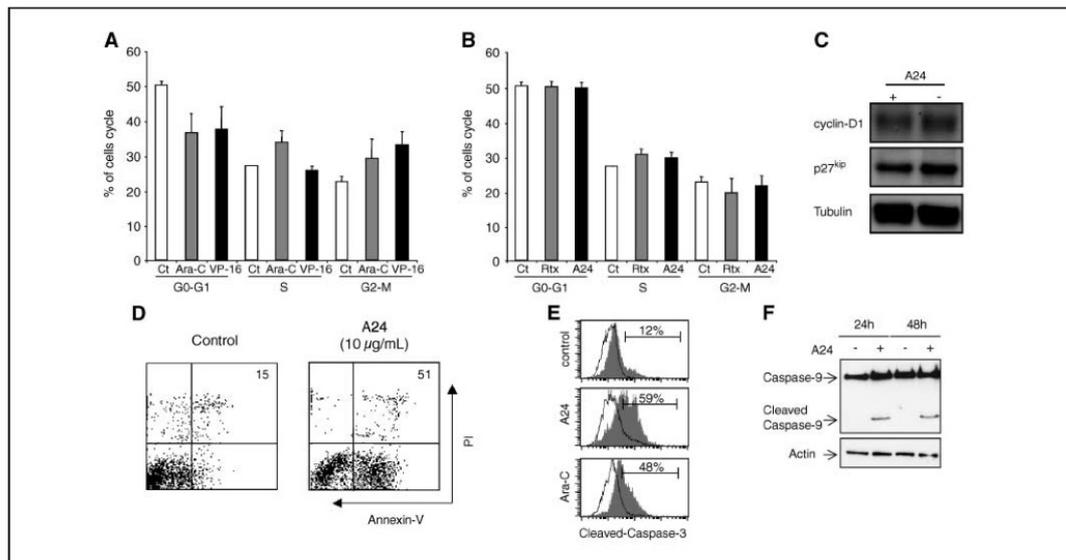
EBV transformation is widely used to generate MCL cell lines; thus, MCL tumor cell lines derived from patients are generally EBV positive. Therefore, as a first step, to avoid confounding factors due to EBV infections, we screened MCL cell lines to diagnose EBV infection (28). Four of five MCL cell lines (REC-1, Granta-519, JVM-2, and NCEB-1) were found positive for EBV, and only one MCL cell line (UPN1) was EBV negative (data not shown). Therefore, Granta-519 and UPN1 were used in the subsequent experiments to analyze both EBV-infected and non-infected MCL cells. Phenotypic analysis showed that TfR and CD20 are expressed on both EBV<sup>-</sup> and EBV<sup>+</sup> MCL cells (Fig. 1D and E). Taken together with immunohistochemistry data from MCL patients, these results reveal the high level of TfR expression in MCL cells *in vivo* and *in vitro*.

**A24 prevents tumor establishment and development in athymic nude mouse model.** We established an *in vivo* model to evaluate A24 effect on MCL tumor development. The MCL cell line UPN1 was injected s.c. in nude mice followed by one single i.v. injection of A24 (40 mg/kg) or vehicle as a control. Eight days after tumor cell injection, all mice in the control group had developed tumors (20 of 20) and died 2 weeks later. Remarkably, none of the A24-treated mice (10 of 10) developed tumors; consequently, none of them died (Fig. 2A).

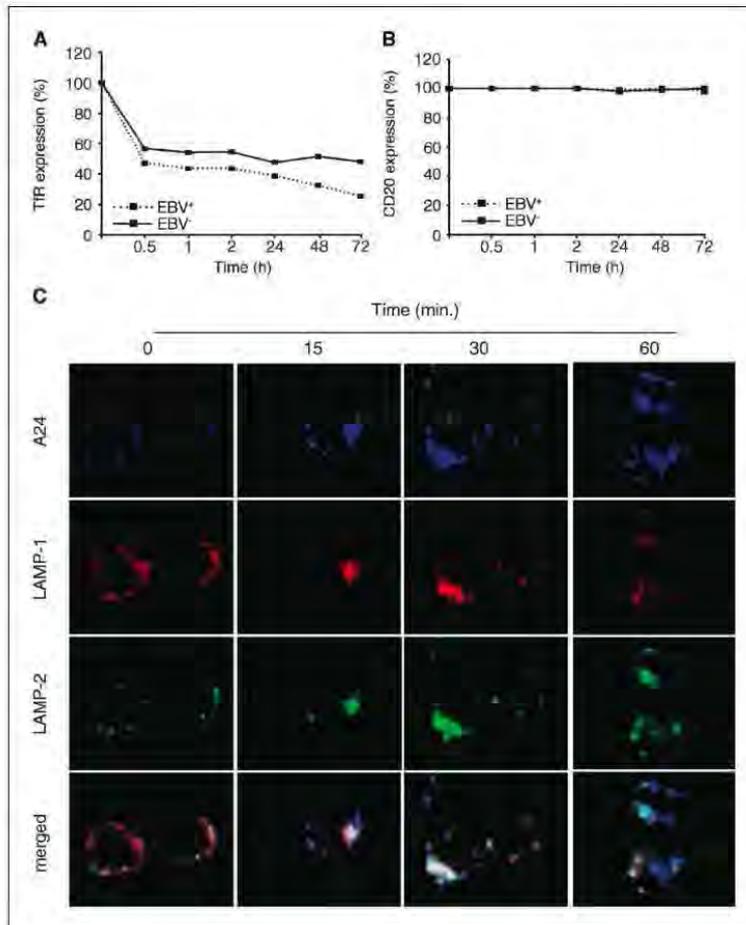
We then tested the effect of A24 on the growth rate of MCL (UPN1) tumors. Mice bearing established tumors were treated with

only one dose of A24 (40 mg/kg; 10 mice) or excipient alone (9 mice). As shown in Fig. 2B, injection of a single dose of A24 in mice bearing pre-established tumors significantly delayed tumor growth compared with controls after a lag time of 3 days. Additionally, it significantly slowed down tumor growth because tumors in A24-treated mice grew with roughly half the rate of the tumors in control mice. A24 single injection also increased mice survival (Fig. 2C). Twenty percent of the A24-treated mice still survived 24 days after injection of the antibody, whereas all control mice had died by day 17. Collectively, these results underscore the potent anti-MCL activity of A24 and open the possibility that A24-derived immunotherapy could be efficient in preventing relapse and could prevent primary tumor growth and disease progression.

**A24 and chemotherapeutic agents affect MCL cell proliferation.** Because A24 had proven *in vivo* efficient antitumor properties, a series of *in vitro* experiments were carried out to study in greater detail its mechanism of action on MCL cells. We compared the effect of an antibody directed against the B-cell marker CD20 (rituximab), validated in human therapy, with that of A24 on the proliferation of MCL cell lines. Granta-519 (EBV<sup>+</sup>) and UPN1 (EBV<sup>-</sup>) cells were cultured for 72 h in the presence of A24 or of rituximab at various concentrations (0.625–10  $\mu$ g/mL), and cell proliferation was evaluated by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation. Both MCL cell lines were sensitive to A24, and 85% inhibition of cell proliferation was reached at a low concentration of antibody (1.25  $\mu$ g/mL; Fig. 3A). By contrast, rituximab that relies mostly on complement-dependent and/or antibody-directed cell cytotoxicity



**Figure 4.** A24 induces apoptosis of MCL cells. *A* and *B*, MCL chemotherapeutic agents (ara-C and VP-16), but not A24, induce cell cycle arrest. MCL cells were cultured in the presence of VP-16 (100 ng/mL) and ara-C (1 ng/mL), rituximab (10  $\mu$ g/mL), or A24 (10  $\mu$ g/mL) for 24 h. Cell cycle was assessed by flow cytometry using propidium iodide after Triton X-100 permeabilization to determine G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>, S, and G<sub>2</sub>-M phases. *C*, A24 does not alter expression of cell cycle cyclin D1 or p27<sup>kip</sup> proteins. Protein extracts obtained from UPN1 MCL cell line cultured 72 h in the absence or the presence of A24 were resolved by SDS-PAGE and blotted using anti-cyclin D1 and anti-p27<sup>kip</sup> antibodies. Antitubulin antibodies were used as a control for sample equal loading. *D–F*, A24 induces apoptosis of MCL cells. *D*, UPN1 cells were cultured in the absence or in the presence of 10  $\mu$ g/mL A24. Apoptosis was evaluated by Annexin V and propidium iodide staining. Numbers indicate the percentage of apoptotic cells. *E*, MCL cells were cultured in the presence of medium, ara-C (4 ng/mL), or A24 (10  $\mu$ g/mL). Apoptosis was examined after 24 h by flow cytometry using a mAb against the cleaved form of caspase-3 revealed with an anti-mouse-PE (closed histograms) and compared with corresponding control isotype-PE (open histograms). *F*, MCL cells were cultured in the presence of medium or A24 (10  $\mu$ g/mL). Apoptosis was examined by immunoblotting using anti-caspase-9 antibody. Antiactin immunoblotting was used to control for equal protein loading.



**Figure 5.** A24 induces TIR endocytosis and sequestration in LAMP-positive compartments through an AP-2-dependent pathway. *A* and *B*, A24 but not rituximab induces receptor internalization. *A*, TIR cell surface expression is reduced after A24 treatment (0–72 h) on EBV<sup>-</sup> (continuous line) and EBV<sup>+</sup> (discontinuous line) transformed MCL cells. *B*, CD20 cell surface expression is not altered on MCL lines after rituximab treatment. *C* and *D*, A24 induces TIR internalization in acidic vesicles. Confocal microscopy analysis of A24/TIR complexes endocytosis. *C*, A24/TIR complexes colocalize with LAMP-positive compartments. UPN1 cells were stained at 4 °C with A24 and plated under culture conditions at 37 °C for 0 to 60 min. After labeling, A24/TIR complexes visualized by a goat anti-mouse-Cy5 (blue) were found at the cell surface and did not colocalize with lysosomal antigens (LAMP-1 and LAMP-2; stained in red and green, respectively). During the culture of the cells at 37 °C, A24/TIR complexes are internalized and rapidly colocalize with both LAMP lysosomal antigens (white).

(ADCC; ref. 29) induced only a minor effect on cell proliferation (up to 30% inhibition at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

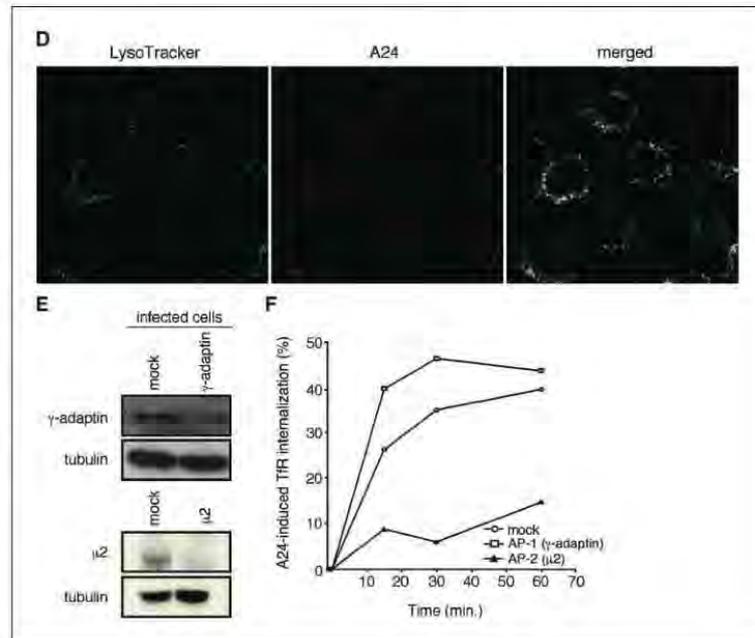
Previous studies showed that rituximab improves the prognosis of MCL when combined with chemotherapy (30). We therefore examined the combined action of A24 with conventional anti-MCL chemotherapeutic agents. Pharmacologic concentrations of doxorubicin (Adriablastin), ara-C (Aracytine), and VP-16 (etoposide) were tested *in vitro* in combination with the IC<sub>50</sub> concentration of A24 in both EBV<sup>+</sup> and EBV<sup>-</sup> cell lines. Whereas A24 promoted an inhibition of proliferation of both MCL cell lines at least comparable with VP-16 and ara-C, Adriablastin showed only a marginal effect on EBV<sup>-</sup> and had no effect on EBV<sup>+</sup> cells. Interestingly, the combined effect of A24 with VP-16 or with ara-C was significantly more pronounced than that of any of these agents alone. This difference was more markedly observed in EBV<sup>-</sup> cells (Fig. 3*B* and *C*). Thus, A24 showed an inhibiting effect on MCL cell proliferation that was both comparable with and synergistic with conventional chemotherapeutic agents.

#### A24 induces apoptosis but not cell cycle arrest of MCL cells.

Overexpression of *cyclin D1* is the hallmark of MCL, and translocation of this gene is correlated with the molecular proliferative signature of the disease. It is currently admitted that overexpression of cyclin D1 results in the sequestration of the p27<sup>kip</sup> cell cycle inhibitor, thus enhancing proliferation of these tumor cells (31). Given these particular alterations in cell cycle, several studies have been concentrated on the use of cell cycle inhibitors as therapeutic agents of MCL. We therefore compared the cell cycle status of MCL cells treated by ara-C, VP-16, rituximab, and A24 (Fig. 4*A* and *B*). As it is well established, ara-C and VP-16 block MCL cells in S and G<sub>2</sub>-M phases, respectively. A24, however, did not block the cell cycle at any particular stage. Accordingly, cyclin D1 expression was not down-regulated in MCL cells treated with A24 (Fig. 4*C*).

The absence of the effect of A24 on the cell cycle prompted us to investigate its proapoptotic effect. Apoptosis of MCL cells was evidenced by analysis of phosphatidylserine externalization and

**Figure 5** *Continued.* **D**, colocalization of A24-encysted TfR and lysosomotropic probe (LysoTracker). UPN1 cells were incubated at 4°C with A24 and plated under culture conditions at 37°C for 60 min. Fifteen minutes before incubation, LysoTracker (green) was added to decorate acidic compartments. After labeling, A24/TfR complexes visualized by a goat anti-mouse-Cy3 (red). Original magnification, ×400. **E**, decreased expression of  $\mu$ 2 and  $\gamma$ -adaptin in lentivirus vector transduced cells. Western blot analysis of  $\mu$ 2 and  $\gamma$ -adaptin expression in DG-75 cells infected with lentivirus coding for  $\mu$ 2 or  $\gamma$ -adaptin shRNA or with mock lentivirus (encoding for GFP only). Antitubulin immunoblotting was used to control for equal protein loading. **F**, AP-2 depletion abrogates TfR internalization. Lentivirus coding shRNA for AP-1 or AP-2 target sequences or mock lentivirus were used to infect DG-75 cells. Transduced cells were then subjected to A24-induced TfR internalization, and TfR membrane expression was assessed by surface labeling.



caspace activation. A24 induced cell apoptosis observed by phosphatidylserine externalization (50% Annexin V<sup>+</sup> cells versus 15% Annexin V<sup>+</sup> cells; Fig. 4D). Both ara-C and A24 induced cleavage of caspase-3 in 50% and 60% of cells, respectively, which was highly significant compared with control cells (12%; Fig. 4E). Additionally, A24 also induced caspase-9 cleavage (Fig. 4F). Thus, A24 induced MCL cell apoptosis without affecting the cell cycle at any particular phase.

**A24 induces TfR endocytosis to the lysosomal compartment dependent of AP-2 complex.** TfR is the paradigm of receptor-mediated endocytosis. Under physiologic conditions, TfR endocytosis is induced by Fe-loaded (holo)-transferrin (Fe-Tf). However, it has been shown previously that TfR capping by anti-TfR antibodies can also induce receptor internalization (15, 32). Thus, we next investigated if A24 induced TfR endocytosis in MCL cells. Cells were incubated in the presence of A24 or rituximab for different lengths of time and then cell surface stained with anti-TfR and anti-CD20 antibodies recognizing epitopes that do not overlap with A24 (15) or rituximab, respectively. A24 induced a rapid decrease of receptor expression affecting 40% to 50% of receptors within the first 30 min of culture. Both EBV<sup>+</sup> and EBV<sup>-</sup> MCL cell lines were sensitive to A24-induced TfR down-regulation (Fig. 5A). By contrast, rituximab did not affect CD20 expression (Fig. 5B).

As it is well established, diferric transferrin/TfR complex is endocytosed in peripheral cytoplasmic sorting endosomes (pH 6.2) and recycling endosomes (pH 6.4). After iron dissociation, apotransferrin and TfR recycle back to the cell surface (33). However, we previously reported that A24 induces receptor down-regulation, leading to a reduced Fe-Tf uptake (15). Thus, we explored the possibility that A24 might impair TfR recycling through receptor degradation in lysosomes. MCL cells were

treated with A24 at 4°C to block vesicular trafficking and, after washes, were cultured at 37°C for up to 60 min. Differential localization of A24/TfR complexes and of lysosomal markers (LAMP-1 and LAMP-2) at different time points after receptor triggering were visualized by confocal microscopy (Fig. 5C). In cells that were not incubated at 37°C, TfR/A24 complexes (stained in blue) were observed at the cell surface and did not colocalize with LAMP-1 and LAMP-2 antigens (stained in green and red, respectively). After 15 min of incubation at 37°C, TfR/A24 complexes started to be found in submembrane vesicular compartments containing LAMP-1 and LAMP-2 markers. Because TfR recycling is rapid, being completed within 15 min, we examined the fate of the receptor at later time points. After 30 to 60 min of incubation, A24/TfR complexes still had not recycled to the cell surface but instead remained colocalized with LAMP, showing that A24 directed TfR to lysosomal compartments (Fig. 5C). We also confirmed the colocalization between A24/TfR complexes and lysosomal vesicles using fluorescent probes for cellular compartments with low internal pH. As observed in Fig. 5D, A24/TfR complexes colocalize with LysoTracker-positive compartments.

Next, we asked whether, similarly to TfR endocytosis in the recycling pathway, the initial steps involved in A24-induced receptor down-regulation are AP-2 and clathrin dependent. For this purpose, we used shRNA constructs in recombinant lentivirus vector to knock down the  $\mu$ 2 subunit of AP-2 heterotetramer adaptor complexes, and as a control, we knocked down the  $\gamma$ -adaptin subunit of AP-1 adaptor complexes that were previously shown to mainly participate in budding of clathrin-coated vesicles from the trans-Golgi network. These shRNA sequences specifically target  $\mu$ 2 and  $\gamma$ -adaptin genes to induce protein knockdown (20).

The extent of specific depletions was evaluated by immunoblot analysis that compared the levels of these proteins with that in cells transfected with mock [encoding for green fluorescent protein (GFP) only] lentivirus vector as a control. Infection of cells with AP-1 and AP-2 shRNA-lentivirus vectors significantly reduced expression of the targeted proteins (Fig. 5E). Cells knocked down for either adaptor complexes were then incubated with A24 to determine if TfR endocytosis mediated by this antibody was dependent on AP-2. AP-2 depletion resulted in a dramatic reduction of A24-induced TfR internalization (Fig. 5F). By contrast, AP-1 depletion did not significantly alter TfR modulation. Therefore, the initial step of A24-induced TfR endocytosis followed the same initial intracellular route as those used by Fe-Tf/TfR complexes.

## Discussion

MCL accounts for 6% to 7% of non-Hodgkin's lymphomas and is characterized by a proliferation gene expression phenotype that involves cyclin D1 overexpression (4, 34). MCL patients have a high degree of primary and secondary treatment resistance, and this disease remains the lymphoma subtype with the poorest long-term outcome and with the highest fraction of death from lymphoma (35, 36).

In spite of recent progress in MCL treatment, the disease prognosis remains poor mainly due to the intrinsic resistance of malignant cells to conventional chemotherapy (37–39), and virtually, all patients, even those who exhibit complete response, will relapse. Because CD20 antigen is expressed in the majority of non-Hodgkin's lymphomas, including MCL, immunotherapy with anti-CD20 antibodies (rituximab) have been used (40, 41). However, in contrast with the broad expression of CD20, rituximab alone has been successful to induce partial or complete responses in only 20% to 40% of MCL patients (42, 43). Although rituximab immunotherapy in association with conventional chemotherapy increased response rate in MCL, its beneficial effect on overall survival remains to be shown (5, 30). More importantly, rituximab-relapsed MCL patients lose CD20 expression on tumor cells, presenting subsequently both chemotherapeutic resistance and rituximab unresponsiveness. Thus, discovering new therapeutic approaches to increase significantly response rate and to prevent relapse remains the major challenge in MCL (44).

Given the importance of TfR in iron uptake, impairing this function may promote cell death (45, 46). TfR is necessary for cell proliferation and is highly expressed on rapidly growing tumor cells, in particular in solid tumors (47), but not on their normal counterparts, supporting TfR as an antitumoral target. The data presented herein suggest that A24-based therapy might be useful not only in blocking MCL tumor growth but also in a preventive setting to tumor relapses. Our *in vivo* experiments show that A24 can act on pre-established tumors because A24 was efficient in decreasing tumor growth rate and in extending mice survival. Other studies in animal models have been done using other anti-TfR blocking antibodies such as mAb 42.6. Although this mAb is effective *in vitro* on cultured tumor cells, it did not induce significant effects on solid tumors (48). However, in humans, phase Ia trial with mAb 42.6 was well tolerated, highlighting the safety of anti-TfR immunotherapy, the major side effects of this treatment being an increased serum iron and Tf saturation (49). Yet, no partial or complete remission of tumor growth was observed. By contrast, here, we show that A24 is able to target tumor cells *in vivo* in a solid tumor context.

Based on the evidence provided herein, immunotherapeutic strategies derived from the anti-TfR mAb A24 are expected to have a strong potential in preventing relapse in MCL patients. Indeed, *in vivo* administration of A24 completely prevented tumor establishment in all the mice tested (10 of 10). This was achieved with one single injection of the antibody, whereas all mice that had been treated with the vehicle alone died within 2 weeks as a consequence of tumor development (20 of 20). Our immunohistochemical analysis revealed that TfR and Ki-67 expression were correlated. Interestingly, Ki-67 expression was previously associated to a shorter survival of patients (50). In addition, it was recently shown that the *TfR* gene is up-regulated in MCL relapses (51). Therefore, it is expected that A24-based immunotherapy may be even more efficient to target chemotherapeutic resistant clones in relapsing patients. Thus, based on our murine *in vivo* preventive model A24-derived therapies might be efficient to prevent relapse in the setting of minimal residual tumoral cells such as that observed after first-line treatments of the disease.

We have previously established that A24 competes with transferrin for receptor binding with  $K$  equal to 2.7 nmol/L. A24 cytotoxicity was shown to be restricted to malignant cells because a high density of TfR expression is required for its efficient binding, whereas in nonmalignant cells expressing low receptor levels, binding of transferrin over A24 is favored (15). Thus, A24-targeted cells are largely ineffective to endocytose Fe-Tf and consequently enter apoptosis similarly to that induced by iron-chelating agents (15).

In an attempt to improve outcome of MCL, various drug combinations, including alkylating agents, anthracyclines, and purine analogues, have been explored in MCL patients. They all failed to substantially improve the long-term survival (52). Resistance to alkylating agents and to anthracycline could be due to  $\pi$ -class glutathione *S*-transferase, whose gene located in 11q13 could be coamplified along with the *cyclin D1* gene (53). Here, the ability of A24 to inhibit MCL cell proliferation was comparable with that of ara-C or of VP-16, and their combined action was even stronger. In contrast to chemotherapeutic agents, A24 does not affect cell cycle but induces cell apoptosis through an intrinsic pathway as assessed by caspase-9 and caspase-3 cleavage. In addition to chemotherapy, immunotherapeutic agents, such as rituximab, have raised hope for improved efficacy. Here, whereas rituximab has only a marginal effect on MCL proliferation *in vitro*, A24 has a high inhibiting capacity (~85% inhibition at 7.5 nmol/L, whereas rituximab reaches only ~25%). In addition, whereas rituximab mainly relies on ADCC, A24 directly acts on target cells independently of complement, of antibody aggregation, or of immune cell activity. Therefore, A24 could be also a complement to chemotherapy and to other immunotherapeutic agents in first-line treatments.

A24 but not the anti-CD20 antibody (rituximab) induces receptor endocytosis in MCL cells. Down-modulation of TfR expression by A24 is rapid, reaching 50% within 30 min of receptor engagement. AP-2 complex is the key to distinguish between two endocytic pathways, the prototypes of which being epidermal growth factor receptor and TfR, respectively. The TfR natural ligand Fe-Tf induces receptor endocytosis through an AP-2-dependent pathway. As A24 induces TfR endocytosis in a nonphysiologic setting, we questioned whether this triggering is dependent on the classic AP-2-dependent mechanism. A24-induced endocytosis was abrogated in AP-2-deficient cells, suggesting that binding of either Fe-Tf or A24 induced similar initial steps for receptor endocytosis.

45. Richardson DR. Molecular mechanisms of iron uptake by cells and the use of iron chelators for the treatment of cancer. *Curr Med Chem* 2005;12:2711-29.
46. Richardson DR, Ponka P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* 1997;1331:1-40.
47. Ryschich E, Huszty G, Knaebel HP, Hartel M, Buchler MW, Schmidt J. Transferrin receptor is a marker of malignant phenotype in human pancreatic cancer and in neuroendocrine carcinoma of the pancreas. *Eur J Cancer* 2004;40:1418-22.
48. Taetle R, Honeysett JM. Effects of monoclonal anti-transferrin receptor antibodies on *in vitro* growth of human solid tumor cells. *Cancer Res* 1987;47:2040-4.
49. Brooks D, Taylor C, Dos Santos B, et al. Phase Ia trial of murine immunoglobulin A antitransferrin receptor antibody 42/6. *Clin Cancer Res* 1995;1:1259-65.
50. Raty R, Franssila K, Joensuu H, Teerenhovi L, Elonen E. Ki-67 expression level, histological subtype, and the International Prognostic Index as outcome predictors in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2002;69:11-20.
51. Ek S, Björck E, Porwit-MacDonald A, Nordenskjöld M, Borrebaeck CA. Increased expression of Ki-67 in mantle cell lymphoma is associated with de-regulation of several cell cycle regulatory components, as identified by global gene expression analysis. *Haematologica* 2004; 89:686-95.
52. Vandenberghe E, De Wolf-Peeters C, Vaughan Hudson G, et al. The clinical outcome of 65 cases of mantle cell lymphoma initially treated with non-intensive therapy by the British National Lymphoma Investigation Group. *Br J Haematol* 1997;99:842-7.
53. Bennaceur-Grisicelli A, Bosq J, Koscielny S, et al. High level of glutathione-S-transferase pi expression in mantle cell lymphomas. *Clin Cancer Res* 2004;10: 3029-34.

## **Human Erythroleukemia: Is the two-hit model of mouse leukemogenesis valid in human disease?**

Séverine Coulon, Julie Vandekerckhove, Michaël Dussiot, Céline Callens, Felipe Suarez, Joelle Kersual, Vahid Asnafi, Zakia Belaid, Geneviève Courtois, Stéphane Giraudier, Patrice Dubreuil, Yves Lepelletier, Ivan C. Moura, Olivier Hermine  
Leukemia. 2007 Oct;21(10):2212-4

### **Contexte du travail:**

Les érythroleucémies (LAM6 dans la classification FAB) sont des maladies rares et de mauvais pronostic du fait d'une importante chimiorésistance. Un modèle d'oncogénèse à deux étapes suggère que la transformation leucémique proviendrait de deux événements moléculaires synergiques, l'un induisant un arrêt de différenciation par des anomalies moléculaires de facteurs de transcription et l'autre provoquant une survie et une prolifération anormale liées à l'activation constitutive de kinases. Ce concept a été récemment décrit dans un modèle murin d'érythroleucémie [Kosmider, 2005 #19]. Nous avons voulu vérifier si ce modèle était également valide dans les érythroleucémies humaines.

### **Résultats:**

Nous avons recherché les anomalies moléculaires d'un patient atteint de LAM6 (blastes CD36<sup>+</sup>, GPA<sup>+</sup>, C-Kit<sup>+</sup>, GP41<sup>-</sup>) et montré l'absence de toute anomalie sur les facteurs de transcription (tels que GATA-1 et PU-1), ainsi que sur les tyrosines kinase (comme JAK-2 et C-Kit).

### **Perspectives:**

La recherche de ces anomalies devrait être étendue à d'autres patients atteints de LAM6, mais la très faible fréquence de cette pathologie rend le recrutement difficile. D'autre part, nous avons testé l'anticorps anti-RTf1 A24 sur les blastes de ce patient qui a montré une très bonne efficacité avec plus de 70% de blastes en apoptose (annexine V<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>) dès 24 heures de traitement (données non publiées). Ainsi, la privation en fer semble être une approche thérapeutique attractive pour ce type de pathologies.

60% (range 45–64%), which was significantly higher than the allelic burden of the entire *JAK2* V617F-positive cohort ( $P=0.01$ ).

These data indicate significant heterogeneity in *JAK2* V617F allele burden in ET with respect to cell type, age and gender but lack of correlation with disease duration and micro- or macrovascular thrombosis. The lack of correlation of *JAK2* V617F allele burden with vascular events in our ET cohort is similar to the previous negative experience relating *JAK2* V617F expression to vascular risk in ET,<sup>5,8</sup> but contrasts with some other observations.<sup>2</sup> These differences may reflect the inadequacy of clinical criteria to distinguish ET from PV, reliance in other studies solely on qualitative *JAK2* V617F expression as a marker for ET, and possibly ascertainment bias of the recruited ET patients.

Finally, the gender differences in both the neutrophil allelic burden and the discrepancy between neutrophil and platelet burden in ET suggest the existence of important but as yet unidentified biological modifiers of *JAK2* V617F expression. Many subjects expressing *JAK2* V617F harbor this mutation at low levels that do not appear to become clonally dominant in the peripheral blood, and our data indicate that women may suppress the tendency for clonal expansion in the peripheral blood more effectively than men. Importantly, quantitative differences in the neutrophil *JAK2* V617F allelic burden between ET and PV suggest biological differences between these disorders, but expression of the mutation *per se* does not appear to account for a predisposition to either thrombosis or hemorrhage in ET patients.

#### Acknowledgements

This research was supported by a grant from the Myeloproliferative Disorders Foundation and Grants RO1-HL 082995 and PO1-CA108671 from the National Institutes of Health and Grant MPO 48019 from the Department of Defense.

N Pemmaraju, AR Moliterno, DM Williams, O Rogers and JL Spivak  
Hematology Division, Department of Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA  
E-mail: jlsivak@jhmi.edu

#### References

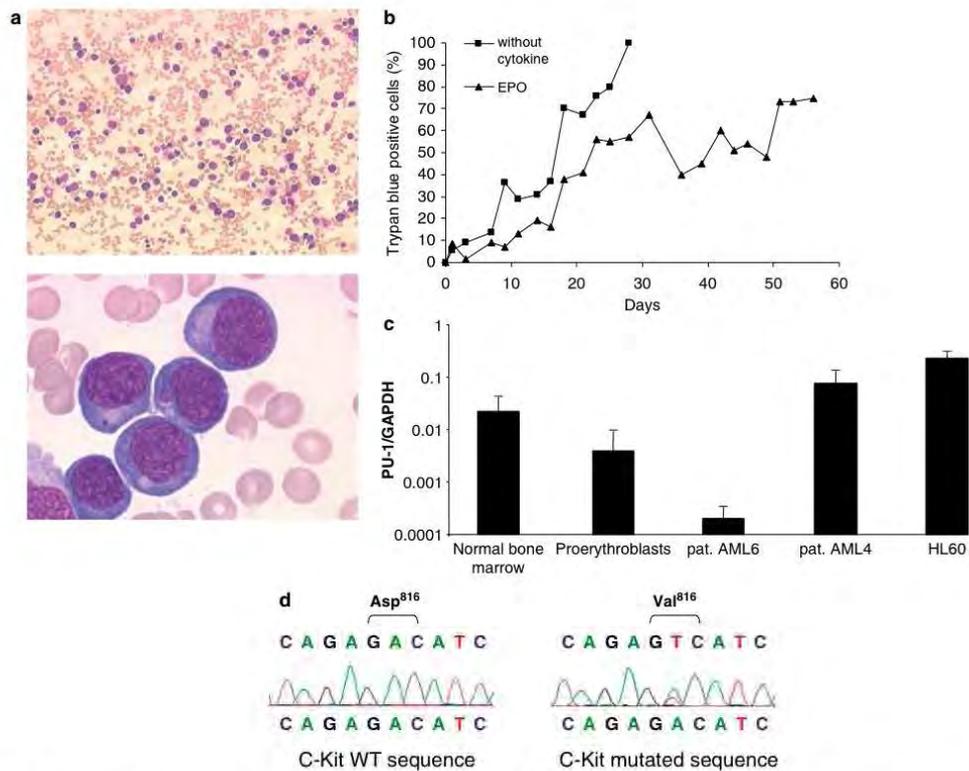
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; **365**: 1054–1061.
- Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT *et al.* Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on *JAK2* V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005; **366**: 1945–1953.
- Moliterno AR, Williams DM, Rogers O, Spivak JL. Molecular mimicry in the chronic myeloproliferative disorders: reciprocity between quantitative *JAK2* V617F and *Mpl* expression. *Blood* 2006; **108**: 3913–3915.
- Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Della Porta MG, Boveri E, Pascutto C *et al.* Relation between *JAK2* (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood* 2006; **107**: 3676–3682.
- Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, McClure RF, Wadleigh M, Lee SJ *et al.* *JAK2* mutation in essential thrombocythaemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol* 2005; **131**: 208–213.
- el Kassas N, Hetet G, Briere J, Grandchamp B. Clonality analysis of hematopoiesis in essential thrombocythemia: advantages of studying T lymphocytes and platelets. *Blood* 1997; **89**: 128–134.
- Kiladjian JJ, Elkassas N, Cassinat B, Hetet G, Giraudier S, Balitrand N *et al.* Essential thrombocythemias without V617F *JAK2* mutation are clonal hematopoietic stem cell disorders. *Leukemia* 2006; **20**: 1181–1183.
- Antonioni E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V *et al.* Clinical implications of the *JAK2* V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2005; **19**: 1847–1849.

## Human erythroleukemia: is the two-hit model of mouse leukemogenesis valid in human disease?

*Leukemia* (2007) 21, 2212–2214; doi:10.1038/sj.leu.2404779; published online 31 May 2007

Human erythroleukemia (HEL) is a rare heterogeneous entity representing 3–4% of acute myeloid leukemia (AML).<sup>1</sup> According to the World Health Organization (WHO), HEL is classified into three subgroups: (1) leukemia with multi-lineage dysplasia; (2) therapy-related AML and myelodysplastic syndromes and (3) acute erythroid leukemia subdivided in erythroleukemia (erythroid/myeloid) and pure erythroid leukemia. HEL affects preponderant males, and the age distribution of the disease appears to be bimodal, with a smaller peak below 20 years and a more definitive and broader peak in the seventh decade of life.<sup>2</sup> The oncogenesis of erythroleukemia in humans is not well known and may differ in the different subgroups. In animal models, erythroleukemia was recently proposed to evolve a multistep oncogenic process.<sup>3</sup> In transgenic mice, Spi-1/PU.1 hyperexpression induces the emergence of erythropoietin (Epo)-

dependent proerythroblasts. This early blockage in erythroblast differentiation leads to anemia that can be treated by transfusion. However, in particular circumstances, growth-factor-independent malignant cells emerge leading to an acute leukemic phase. This oncogenic event is associated with the gain-of-function mutations in the *Kit* gene, conferring a constitutive receptor kinase activity and cell proliferation related to Erk1/2 and PI3K/Akt pathways activation. Nevertheless, this two-hit model of leukemogenesis has not been yet described in human erythroleukemia. We studied here the case of a 60-year-old male fulfilling the WHO classification criteria for erythroid leukemia (erythroblasts immunophenotyped as CD36<sup>+</sup>, GPA<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup>, GP41<sup>-</sup>) with multiple karyotype abnormalities. This patient showed a massive (over 60%) bone marrow proerythroblastic infiltration (Figure 1a). In order to study the response of HEL blasts to the major erythroid growth factor, patient bone marrow aspirates were cultured in the presence or absence of Epo. The addition of Epo in culture medium allowed a long-term survival of blast cells (Figure 1b). These data suggest that blasts



**Figure 1** (a) Bone marrow aspirate smear containing undifferentiated cells having basophilic cytoplasm and round cell nucleus characteristic of proerythroblasts (May-Grunewald-Giemsa magnification  $\times 400$  and  $\times 1000$ ). (b) Cell proliferation curves of cultured proerythroblasts in the presence or absence of erythropoietin (2 U/ml). (c) Real-time quantitative reverse transcription-PCR analysis for PU.1 mRNA expression. Values obtained for normal bone marrow, cultured proerythroblasts, AML6 and AML4 patient blasts and HL60 cell line were graphed relative to GAPDH mRNA. Standard deviation of triplicates is represented. (d) Direct sequencing of *c-Kit* exon17: wt sequence found in the AML6 and D816V mutation found in a *c-Kit* mutated mastocytosis patient.

were Epo-sensitive, and therefore specific of erythroid lineage. We also investigated whether the multistage leukemogenesis recently described could be valid in this case of HEL. We sought for the possible hyper-expression of PU.1 in these cells. However, reverse transcription-PCR for PU.1 was negative for this patient (Figure 1c). These results suggest that in this case, high expression of *spi-1/PU.1* is not involved in the arrest of proerythroblast differentiation as in the mouse model. GATA-1 has been shown to play a critical role in terminal erythroid differentiation,<sup>4</sup> and mutations in this gene have been linked to several human hematological disorders including X-linked dyserythropoietic anemia and thrombocytopenia, X-linked thrombocytopenia and beta-thalassemia, and Down's syndrome acute megakaryoblastic leukemia. However, sequencing of GATA-1 shows that this transcription factor was not mutated in this case of human erythroleukemia (not shown). In *Spi-1/PU.1* transgenic mouse, the second event (cell proliferating induction step) of leukemogenesis is the induction of constitutive activation of *c-Kit* due to mutations in codons 814 or 818. However, the most frequent activating mutations in human

neoplasia (codons 560 and 816) were not mutated in this leukemia (Figure 1d and not shown). Moreover, the complete sequence of the gene shows that *c-Kit* gene does not present any particular mutation of exon 8 as observed in some human neoplasia including AML and lymphoma (not shown). We also sequenced the Epo-R adaptor JAK2, since it was recently reported that JAK2 mutation (V617F) is present in most patients with polycythemia vera (PV), myelodysplasia (MSD) and essential thrombocytemia (ET) and some primary myelofibrosis.<sup>5</sup> However, this JAK2 mutation was not present in this patient. Altogether, our data suggest that this particular case of human erythroleukemia does not follow the two-hit model of leukemogenesis observed in transgenic mice. In humans, the only two-hit model described so far is the core binding factor AML<sup>6</sup> in which AML1/ETO or CBF/MYH11 translocation induces myeloid differentiation arrest, and *c-Kit*, Ras or FLT-3 mutations induce cell proliferation and inhibition of apoptosis. Therefore, further investigations in human erythroleukemia are needed to understand the leukemogenesis involved in this still incurable disease.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale (SC), INSERM (poste d'accueil, interne en biologie) (CC), the Association pour la Recherche contre le Cancer and Institut National du Cancer (INCA), Arreca, Canceropole Ile de France.

S Coulon<sup>1</sup>, J Vandekerckhove<sup>1</sup>, M Dussiot<sup>1</sup>, C Callens<sup>1</sup>, F Suarez<sup>2</sup>, J Kersual<sup>1</sup>, V Asnafi<sup>3</sup>, Z Belaid<sup>1</sup>, G Courtois<sup>1</sup>, S Giraudier<sup>4</sup>, P Dubreuil<sup>5</sup>, Y Lepelletier<sup>1</sup>, IC Moura<sup>1,6</sup> and O Hermine<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>CNRS UMR 8147, Université Paris V, Hôpital Necker, Paris, France;

<sup>2</sup>Service d'hématologie, Hôpital Necker, Paris, France;

<sup>3</sup>Service d'hématologie biologique, Hôpital Necker, Paris, France;

<sup>4</sup>Service d'hématologie biologique, Hôpital Henri Mondor, Paris, France and

<sup>5</sup>Hématopoïèse moléculaire et fonctionnelle, U119 INSERM, Marseille, France

E-mail: hermine@necker.fr

<sup>6</sup>Current address: INSERM U699, Paris, France

References

- 1 Davey FR, Abraham Jr N, Brunetto VL, MacCallum JM, Nelson DA, Ball ED et al. Morphologic characteristics of erythroleukemia (acute myeloid leukemia; FAB-M6): a CALGB study. *Am J Hematol* 1995; 49: 29–38.
- 2 Kowal-Vern A, Mazzella FM, Cotelingam JD, Shrit MA, Rector JT, Schumacher HR. Diagnosis and characterization of acute erythroleukemia subsets by determining the percentages of myeloblasts and proerythroblasts in 69 cases. *Am J Hematol* 2000; 65: 5–13.
- 3 Kosmider O, Denis N, Lacout C, Vainchenker W, Dubreuil P, Moreau-Gachelin F. Kit-activating mutations cooperate with Spi-1/PU 1 overexpression to promote tumorigenic progression during erythroleukemia in mice. *Cancer Cell* 2005; 8: 467–478.
- 4 Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 1215–1227.
- 5 James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434: 1144–1148.
- 6 Boissel N, Leroy H, Brethon B, Philippe N, de Botton S, Auvrignon A et al. Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia* 2006; 20: 965–970.

Donor-derived mucosal epithelial cells after human hematopoietic cell transplantation are not derived from the CD34-positive fraction of the graft

*Leukemia* (2007) 21, 2214–2216; doi:10.1038/sj.leu.2404759; published online 31 May 2007

Although bone marrow transplantation (BMT) has been a part of clinical practice for more than 30 years, it was only recently realized that hematopoietic cellular infusions used in clinical practice may generate 'unexpected' epithelial cell populations *in vivo*.<sup>1</sup> Despite the initial skepticism of the reported observations due to methodological limitations, more recent studies using strict criteria and examinations of isolated single cells have clearly shown that following allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT) in humans, graft-derived epithelial cells emerge.<sup>2,3</sup> The numbers of generated epithelial cells after HCT are low and the underlying mechanism of their occurrence is of major biological significance. Understanding of these mechanisms might be helpful to settle in stem cells for the clinical use of tissue repair. Suggested theories include fusion of donor hematopoietic cells with recipient epithelial cells, generation of epithelial cells from unknown epithelial precursors or universal stem cells, or transdifferentiation of hematopoietic cells.<sup>4</sup> Besides the underlying mechanisms, it is important to trace the cells within the hematopoietic graft that are involved in the development of donor-derived epithelial cells. Hematopoietic grafts contain hematopoietic stem cells, which reside in the CD34-positive fraction capable of establishing a long-term hemopoiesis in the recipient, and other cells, like T cells, mesenchymal cells, dendritic cells or other not better-defined cell populations. The purpose of this study was to analyze whether pure CD34<sup>+</sup> mobilized peripheral blood stem cells (CD34<sup>+</sup> PBSC) are generating epithelial cells *in vivo*.

Eight female patients who underwent allogeneic HCT with MACS-isolated CD34<sup>+</sup> PBSC (purity 98.3%) from male donors were recruited in the study; methodology was as previously described in our former study on unmanipulated PBSC-transplanted (PBST) patients.<sup>4</sup> Briefly, a buccal swab from each patient was obtained at a time point when no mucositis or oral graft-versus-host disease (GvHD) was present, and five cytospins were made from each swab. Four of them were stained with diaminobenzidine (DAB) immunocytochemistry (Sigma, Steinheim, Germany) using either CD45 (HI30, BD, Franklin Lakes, NY, USA), CD3 (SK7, BD), CD15 (MMA, BD) or CD68 (PG-M1, Dako, Glostrup, Denmark) specific antibodies. The fifth slide was stained with a combination of FISH for the X and Y chromosomes (Vysis, Bergisch-Gladbach, Germany), immunofluorescent stain for CK (C-11, FITC-conjugated, Sigma), immunostain for CD45 (2B11<sup>b</sup> / PD7/26, Dako) followed by a goat anti-mouse antibody labeled with Alexa Fluor 633 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and DAPI nuclear counterstain (D-9542, Sigma). The XY/CK/CD45/DAPI-stained slides were evaluated three-dimensionally (3D) by laser-scanning confocal microscopy (TCS/SP2/AOBS, Leica-Microsystems, Germany) and a specialized software (Autovisualize 5.5 (AutoQuant Imaging, USA)) by examiners who had no knowledge of the present or past medical history of the patients. Thereafter, cells were evaluated morphologically by standard hematoxylin/eosin (HE). Y<sup>b</sup>/CK<sup>b</sup>/CD45<sup>b</sup>/DAPI<sup>b</sup>/HE-E<sup>b</sup> cells were identified as donor-derived epithelial cells.

We analyzed a mean of 195 buccal cells/patient. Only one patient exhibited a sporadic X<sup>b</sup>Y<sup>b</sup>/CK<sup>b</sup>/CD45<sup>b</sup>/DAPI<sup>b</sup>/HE-E<sup>b</sup> donor-derived epithelial cell (Table 1). This patient had received additionally donor lymphocyte infusions because of mixed

## **Targeting iron homeostasis induces cellular differentiation and synergizes with differentiating agents in acute myeloid leukemia**

Céline Callens, Jérôme Naudin, Séverine Coulon, Isabelle Radford-Weiss, Nicolas Boissel, Emmanuel Raffoux, Pamela Huey Mei Wang, Vahid Asnafi, Philippe Dessen, Danielle Canioni, Olivia Chandesris, Marie Therese Rubio, Marc Benhamou, Hervé Dombret, Elizabeth Macintyre, Renato C. Monteiro, Ivan C. Moura et Olivier Hermine.

### **Article en révision**

#### **Contexte du travail:**

Les leucémies aigües myéloblastiques (LAM) constituent un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisées par l'expansion clonale de cellules immatures (blastés) appartenant à la lignée myéloïde bloquées dans leur différenciation. Ce sont des pathologies graves où de nouvelles thérapies ciblées sont très attendues du fait du fort taux de rechute. Le ciblage de l'homéostasie du fer semble être une approche attractive du fait des résultats précédents du laboratoire avec l'anticorps anti-RTf A24 dans d'autres hémopathies et d'études publiées sur l'activité anti-tumorale des chélateurs en fer.

#### **Résultats :**

Ce travail montre que la privation en fer (par l'utilisation de chélateurs de fer (deferroxamine (DFO), ou Deferasirox), ou par un anticorps anti-RTf1) induit la différenciation de cellules immatures de la lignée myéloïde (blastés de LAM ou précurseurs issus de sang de cordon) en cellules de la lignée monocyttaire. Cet effet est amplifié quand cette thérapie est associée à un autre agent différenciant, la vitamine D3 (VD). Lors de l'étude du transcriptome des gènes induits par la privation en fer et par la VD, il a été observé que 30 % des gènes induits par la privation en fer l'étaient aussi par la VD et concernaient, entres-autres, des marqueurs monocytaires ainsi que les gènes *c-fos* et *c-jun*. La privation en fer agit en coopération avec la VD via l'activation de la voie des MAPK (p38 et JNK) et en augmentant le nombre de récepteur à la VD à la surface des cellules traitées. Des expériences de xénogreffe chez la souris NUDE ont montré une efficacité accrue de la combinaison DFO/VD par rapport au DFO seul sur la croissance tumorale. Enfin, l'association deferasirox/VD a été testée chez un patient atteint de LAM et réfractaire aux chimiothérapies classiques et a permis l'obtention d'un nombre élevé de monocytes dans la circulation sanguine dont certains présentaient l'anomalie caryotypique initiale des blastés.

**Perspectives:**

Cette étude montre l'importance de la teneur en fer de l'environnement médullaire dans la détermination de la différenciation de la lignée myéloïde vers la lignée monocytaire/macrophagique ou la lignée granuleuse. L'effet différenciant de la privation en fer vers la lignée monocytaire/macrophagique est amplifié par la vitamine D. Ainsi, l'association VD/ chélateur semble constituer une alternative thérapeutique dans le traitement des LAM, dont le pronostic reste encore médiocre à l'heure actuelle. Cette étude fait l'objet du travail de thèse de M<sup>elle</sup> Céline Callens.

**Targeting iron homeostasis induces cellular differentiation and synergizes  
with differentiating agents in acute myeloid leukemia**

Celine Callens<sup>1,\*</sup>, Jerome Naudin<sup>1,2,3</sup>, Séverine Coulon<sup>1</sup>, Isabelle Radford-Weiss<sup>4</sup>, Nicolas Boissel<sup>5</sup>, Emmanuel Raffoux<sup>5</sup>, Pamela Huey Mei Wang<sup>2,3</sup>, Vahid Asnafi<sup>6,7</sup>, Philippe Dessen<sup>8</sup>, Danielle Canioni<sup>9</sup>, Olivia Chandesris<sup>10</sup>, Marie Therese Rubio<sup>10</sup>, Marc Benhamou<sup>2,3</sup>, Hervé Dombret<sup>5</sup>, Elizabeth Macintyre<sup>6,7</sup>, Renato C. Monteiro<sup>2,3</sup>, Ivan C. Moura<sup>2,3</sup> and Olivier Hermine<sup>1,10</sup>

<sup>1</sup> CNRS UMR 8147, Faculté de Médecine and Université René Descartes Paris V, Institut Fédératif Necker, Paris, France.

<sup>2</sup> INSERM, U699, Paris, France.

<sup>3</sup> Faculté de Médecine and Université Denis Diderot Paris VII, Paris, France.

<sup>4</sup> Laboratoire de cytogénétique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France.

<sup>5</sup> Service d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, AP-HP and Faculté de Médecine Université Denis Diderot Paris VII, Paris, France.

<sup>6</sup> Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Necker-Enfants-Malades, AP-HP and Faculté de Médecine and Université René Descartes Paris V, Paris, France.

<sup>7</sup> INSERM, EMI0210, Paris, France.

<sup>8</sup> Unité de Génomique Fonctionnelle, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France,

<sup>9</sup> Service d'Anatomo-Pathologie, Hôpital Necker-Enfants Malades, AP-HP and Faculté de Médecine and Université René Descartes Paris V, Paris, France.

<sup>10</sup> Service d'Hématologie, Hôpital Necker-Enfants Malades, AP-HP and Faculté de Médecine and Université René Descartes Paris V, Paris, France.

\* present adress : Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Necker-Enfants Malades, AP-HP, Paris, France.

**Condensed title** : AML cell differentiation by targeting iron homeostasis

**Total number of characters in the manuscript**: 14.657 words

Address correspondence to: Olivier Hermine, M.D., Ph.D., Centre National de la Recherche Scientifique-Unité Mixte de Recherche 8147, Université Paris V. René Descartes, Hôpital Necker, 161 rue de Sèvres, 75015 Paris, France. Telephone: 33-1-4449-0675; Fax: 33-1-4449-0676; e-mail: [hermine@necker.fr](mailto:hermine@necker.fr) or Ivan Cruz Moura, INSERM U699, , Faculté de Médecine Xavier Bichat. 16, Rue Henri Huchard. F-75870 Paris Cedex 18 Paris, France. Phone : 33-1-5727-730 1 ; FAX : 33-1-5727-7755 ; e-mail : [ivan.moura@inserm.fr](mailto:ivan.moura@inserm.fr).

## ABSTRACT

Differentiating agents have been proposed to overcome the impaired cellular differentiation in AML. However, this strategy has been successful only in AML3 (APL) by the combination of all-trans retinoic acid (ATRA) or arsenic trioxide ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) with chemotherapy. Here we show that iron homeostasis is an effective target in the treatment of non-APL AML. Iron homeostasis-targeting therapy induced the differentiation of leukemia blasts and normal bone marrow precursors into monocytes/macrophages. An analysis of gene expression patterns revealed that 30% of the most significant genes induced by iron homeostasis-targeting therapy are also genes targeted by vitamin D3 (VD). Iron chelating agents acted synergistically with VD through the activation of MAPKs both *in vitro* and *in vivo*. These agents also induced a 4-fold increase in the expression of the vitamin D receptor (VDR) and an over 1,000-fold increase in the expression of genes regulated by VDR. This new therapeutic strategy was used in one AML patient who was refractory to chemotherapy. This resulted in reversal of patient's pancytopenia, reduced blasts counts and induced tumor cells differentiation. We propose that iron availability modulates myeloid cell commitment. Targeting this new cellular differentiation pathway in association with differentiating agents opens a new treatment modality for AML.

## INTRODUCTION

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous malignant disorder originating from mutations in progenitor cells that lead to the unrestrained proliferation of undifferentiated myeloblasts (1). Our understanding of the molecular events leading to AML is constantly in progress, and there is a general consensus that AML leukemogenesis occurs as a multistep process (2, 3). These processes are broadly classified into two groups: gene alterations that confer a proliferative and/or survival advantage to hematopoietic progenitors (*e.g.*, *RAS*, *FLT3* or *KIT* mutations) and mutations in transcription factors, or transcriptional co-activators (*e.g.*, *CEBP $\alpha$* , *NPM1*) that affect hematopoietic differentiation (4, 5). These later mutations most frequently occur as chromosomal translocations, but point mutations that affect hematopoietic differentiation have also been described.

The potential of the currently available chemotherapies to treat AML has probably reached its limit (1, 6). Based on the emerging knowledge of the biology of AML, new therapeutic approaches need to be developed to interrupt proliferation, induce apoptosis and/or override the differentiation block.

Iron is required as a cofactor for a number of critical cellular enzymes involved in energy metabolism and cell proliferation and therefore is essential for all living cells. The transferrin receptor (CD71/TfR1) is an evolutionarily-conserved receptor that is essential for the uptake of iron in mammalian cells (7-9). Cancer cells overexpress TfR1 and are more sensitive to iron depletion than their normal counterparts (10, 11). TfR1 is a validated target for anti-cancer therapy using both monoclonal antibodies (mAb) and drug-conjugated transferrin (12, 13). We have previously characterized an anti-TfR1 antibody (mAbA24) that exhibits potential activity as a therapeutic anti-cancer agent. A24 (14) specifically binds to TfR1<sup>high</sup> cells, competes with iron-loaded transferrin (Fe-Tf) for receptor binding and induces receptor endocytosis and degradation, thereby drastically impairing iron uptake (15-17). Iron chelators have also been proposed for several years as an alternative anti-cancer therapy and effectively induce cell growth arrest and apoptosis in cancer cells *in vitro* and *in vivo* (18-21). However, the molecular mechanisms underlying the anti-tumor effect of iron-chelating therapeutic approaches remain to be fully elucidated (22, 23). We aimed to characterize these mechanisms and to validate their potential value in AML therapy.

Here we show *in vivo*, *in vitro* and *ex-vivo* that targeting iron homeostasis (using both monoclonal antibodies against the transferrin receptor and iron chelators) induces blasts differentiation towards the monocyte lineage in non-APL AML subtypes. Importantly, the combination of both iron chelation and Vit D had a synergistic effect and improved the activation of MAPK pathway which is implicated in cell differentiation and particularly in monocytic differentiation. Finally, we provide data, in the

form of a case report, showing the efficacy of this combination in the induction of tumor cells differentiation in an AML patient. This study provides the proof of concept for the use of combination of iron chelators and vitamin D3 in AML therapy.

## RESULTS AND DISCUSSION

### ***Targeting of iron homeostasis induces AML cell differentiation***

To gain new insights about the molecular mechanisms involved in the anti-tumor effect induced by iron-chelating therapeutic approaches we sought to identify genes that are affected by both iron chelators (deferioxamine (DFO) and deferasirox (DFX)) and by impairment of Fe-Tf uptake by blocking TfR1 function (using the anti-TfR mAb A24 (15-17)). We hypothesized that following this strategy would decrease the probability to identify irrelevant genes that could be related to off-target effects of iron-deprivation therapies. We decided to focus our first studies in a cell line (HL60) to avoid heterogeneity in the data related to the multiple genetic events that have been implicated in AML oncogenesis in individual patients. An analysis of the collected data revealed that 105 genes were modulated by the three different agents (Figure 1a and supplementary table 1). Among these genes, several were related to cell differentiation. Markers of monocytes or activated macrophages were up-regulated by both iron chelators and by the anti-TfR antibody whereas markers of granulocyte differentiation were down-regulated by the iron-deprivation agents (Figure 1b).

We further tested the ability of iron deprivation to override the blockage of cell differentiation in AML. In AML cell lines, the monocyte differentiating agent VD induces the monocyte markers CD14 and CD11b. These markers were also induced by iron deprivation using the A24 mAb, DFO or DFX (Figure 1c and supplementary Figure 1a). The induction of cell surface markers was accompanied by the characteristic cytological modifications of monocytes: iron deprivation induced cytoplasm enlargement and the loss of both cytoplasmic basophilia and azurophilic granules (Figure 1d and supplementary Figure 1b). The up-regulation of differentiation marker expression was abrogated when the cultures were supplemented with an excess of soluble iron, confirming that the primary origin of the monocytic differentiation program is dependent on iron availability (Figure 1e).

We next investigated whether cells from AML patients could also be induced to differentiate upon iron deprivation. Fresh AML blasts from different AML subtypes were isolated at the time of diagnosis (please refer to supplementary table 2 for the complete list of subtypes and biological parameters for the patients used in this study) and were cultured in the presence of mAb A24 and DFO. CD14 and CD11b expression was consistently up-regulated in the treated cultures, indicating that blasts from different AML subtypes, even if heterogeneous in the oncogenic events leading to the arrest of differentiation (1), are susceptible to differentiation therapy based on iron deprivation (Figure 1f). Furthermore, *in vitro* dose-range studies showed that differentiation was accompanied by an arrest of cell proliferation and the induction of apoptosis (supplementary Figures 2a and b).

### ***Targeting of iron homeostasis induces primary progenitors differentiation towards the monocyte lineage***

In order to verify that iron homeostasis plays a role in the differentiation of granulocytes and monocytes, we tested the effect of iron deprivation on primary hematopoietic progenitors. Primary CD34<sup>+</sup> cells were cultured in semisolid medium supplemented with pluripotent cytokines in the presence or absence of iron deprivation agents (iron chelators or anti-TfR1). Treatment with the iron chelators resulted in an increased number of CFU-M colonies to the detriment of growth of CFU-G colonies, suggesting that chelating iron from hematopoietic precursors induces commitment toward the monocyte lineage over the granulocyte lineage (Figure 2a and 2b). However, iron chelation did not change the total number of colonies (data not shown). In liquid culture, iron deprivation did not affect cord blood cell proliferation (Figure 2c), but rather altered their commitment toward the monocytic lineage. Likewise, there was a consistent up-regulation of genes coding for transcription factors specific for the monocyte lineage, such as *HOXA10*, *EGR1* and *MafB* (2, 24-26) (Figure 2d). The cytological evaluation of the cultures confirmed that the monocyte cell number was higher in iron-poor cultures (Figure 2e). Therefore, in the bone marrow niche, iron availability could be an important factor in determining whether a hematopoietic progenitor cell differentiates into a monocyte or a granulocyte.

### ***Cell differentiation induced by iron deprivation is dependent on the activation of the MAPK pathway and shares high similarity with the differentiation agent vitamin D3***

The current treatment modality for the induction of a terminal differentiation program in AML is the use of differentiating agents combined with chemotherapy to treat Acute Promyelocytic Leukemia (APL/AML3) (27-29). The use of all-trans-retinoic acid (ATRA) with chemotherapy was a major breakthrough in leukemia therapy because it dramatically improved the prognosis of APL patients from poor to a complete remission in 75-80% of patients (30). Like ATRA, VD belongs to the steroid superfamily. VD associates with its cognate receptor (VDR) to form a heterodimer with the retinoid X receptor (RXR). This complex then binds to the VD responsive element (VDRE), thereby inducing changes in gene transcription. VD also activates the MAP kinase (MAPK) pathways to modulate the transcription of genes implicated in cell differentiation. Encouraging clinical trials have suggested that VD could be effective as a differentiating agent in the treatment of AML, but the hypercalcemia that occurs as a side effect of VD treatment has limited its use (31-33).

By comparing the pattern of genes induced by VD and iron-chelating agents in a non-supervised analysis, we found a high similarity among the differentially expressed genes: of the 105 genes that

were modulated by iron deprivation, 30 were also modified by treatment with VD (Figure 3a and supplementary Table 3). This finding underscores the potential similarities between both differentiation approaches. Both VD and the iron-chelating agents up-regulated monocyte markers and down-regulated neutrophil markers (Figure 3b). The JUN kinase pathway (JNK) is a major MAPK pathway that has been implicated in monocyte differentiation and has been previously shown to be induced by VD (34, 35). Effectively, the *c-Jun* gene was induced by both VD and iron deprivation (Figure 3c). Moreover, transcripts coding for *c-Fos* and *c-Jun* were also up-regulated by both treatments (Figure 3d). Importantly, the inhibition of JNK by its specific inhibitor, SP600125, abrogated the differentiation induced by iron following treatment with A24 or DFO (Figure 3e). The different MAPK signal transduction cascades (extracellular signal-regulated kinase-ERK, JNK and p38) frequently converge to amplify signal transduction (36, 37). In agreement with this signal convergence, we found that the iron-chelating agents induced the activation of the MAPK-related ERK and p38 pathways, as evidenced by the phosphorylation of their molecular effectors (supplementary Figure 3). Moreover, the selective inhibition of the ERK and p38 pathways blocked cellular differentiation induced by iron deprivation (Figure 3f). However, only inhibitors of JNK and p38 (Figure 3g), but not of ERK (supplementary Figure 4), prevented iron deprivation-induced apoptosis.

***VD synergizes with iron deprivation agents through the activation of the Jun pathway to induce cellular differentiation***

We next investigated whether the combination of iron-chelating agents and VD had a synergistic effect. The treatment of cells with both iron chelators and VD drastically increased the up-regulation of monocyte markers (Figure 4a). This could be explained by the up-regulation of *VDR* gene transcription (Figure 4b), which has been implicated in monocyte differentiation (34, 35). The physiological relevance of increased *VDR* gene expression was demonstrated by the robust increase in the transcription of its downstream target genes, *cathelicidin* (1,000-fold increase) and *CYP24A* (6,000-fold increase) (Figure 4c). The synergy is also due to the activation of the JNK pathway, because *c-Fos* and *c-Jun* expression was notably up-regulated by the combined treatment (Figure 4d). Moreover, the phosphorylation of JNK increased in response to treatment with both VD and iron chelation (Figure 4e). These profound modifications in gene expression were accompanied by morphological changes in the treated cells (Figure 4f). Therefore, the combination of iron deprivation and differentiating agents such as VD could reduce the side effects of combined therapy while intensifying their anti-leukemic properties.

### ***In vivo efficacy of combined iron homeostasis and vitamin D3 treatment through the activation of the MAPK-JNK pathway***

The efficacy of differentiation therapy was further evaluated *in vivo* in a mouse tumor xenograft model. A single dose of mAb A24 completely prevented the growth of the transplanted tumors, whereas treatment with DFO increased survival and decreased the tumor size (Figures 5a and 5b). Furthermore, the combination of VD with DFO significantly reduced tumor growth in mice (Figure 5c). The parameters of serum iron homeostasis, such as the serum transferrin and ferritin levels, were significantly modified in the treated mice, an indication of iron deprivation (Figure 5d). The reduced tumor growth was associated with tumor cell apoptosis, features of cellular differentiation and MAPK phosphorylation (ERK and JNK) (Figure 5e).

### ***Case Report***

Because both iron chelators and VD analogues are safe drugs currently used as therapies in the treatment of diseases other than leukemia, their effectiveness in one AML patient was evaluated. A 69-year-old man had a recent transformation of myelodysplastic syndrome (MDS) into acute myeloid leukemia. Following high-dose chemotherapy, the patient remained in non-blastic aplasia. Seven months after the diagnosis, blasts reappeared in the blood, and treatment with an iron chelator (deferasirox 1 g/day) and 25-hydroxycholecalciferol (25(OH)D3) (4,000 IU/day) was initiated.

Blast counts while progressing before therapy were decreased upon iron chelation and vitamin D therapy and pancytopenia was partially reversed accompanied with an increase in the monocyte number (Figure 6a) without inducing hypercalcemia (Figure 6b). Importantly, MGG blood smears revealed an increased number of differentiating cells in the monocytic lineage, suggesting that they were derived from the blast pool (Figure 6c). Cell sorting (Figure 6d) followed by fluorescent *in situ* hybridization (Figure 6e) analysis showed that the original trisomy found in the blasts of the patient was segregated with the sorted mature monocyte population, but not with lymphocytes or NK cells (Figure 6f), confirming that the circulating monocytes were derived from the blast pool. In addition, patient quality of life was improved since he could control several urogenital infections that otherwise would have been life threatening. These data underscore the differentiating efficiency of combined therapy in humans.

Altogether these results demonstrate that iron homeostasis plays a key role in the control of cellular differentiation in both normal and pathological situations. In iron-poor environments, BM cells are

prone to differentiate into monocytes, and blasts from AML could undergo differentiation in the presence of iron chelators. Gene expression studies demonstrate that genes associated with cellular differentiation are targeted by iron deprivation, and the genes regulated by iron are highly shared (30% of similarity) with the genes regulated by VD. Furthermore, the combination of iron chelation and differentiating therapies increased AML blast differentiation. Therefore, we propose that therapeutic approaches based on this new concept could open new perspectives in the treatment of AML. Since AML incidence increases with age and since worldwide population is growing older we propose that the combined therapy would be particularly useful in elderly patients who are not eligible for bone marrow transplantation and for high dose chemotherapy. Taken together our data provide a new strategy for the treatment of non-APL AML. This combined therapy could be also relevant in other diseases involving a deregulation of BM differentiation, such as myelodysplastic syndromes.

## FIGURES

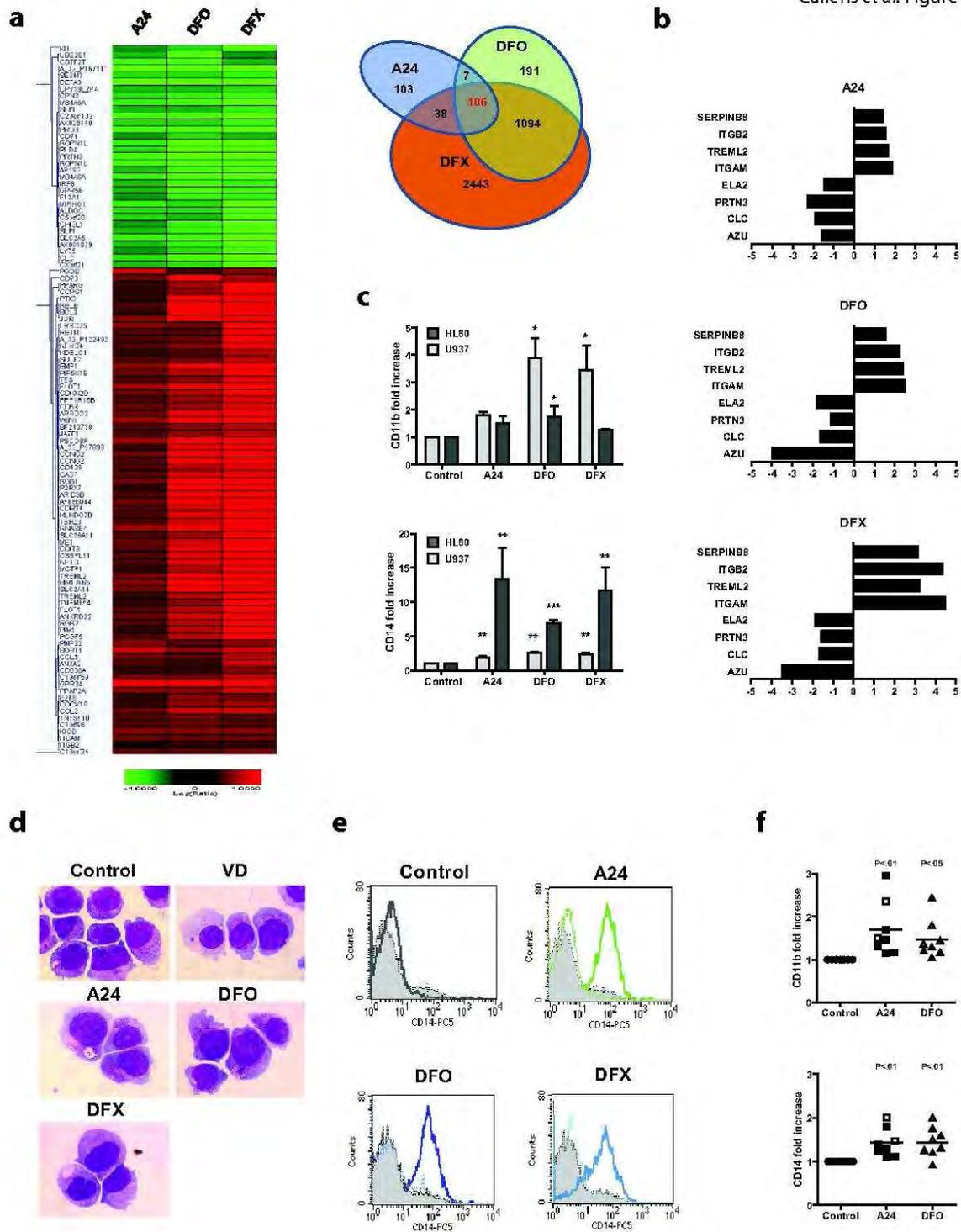
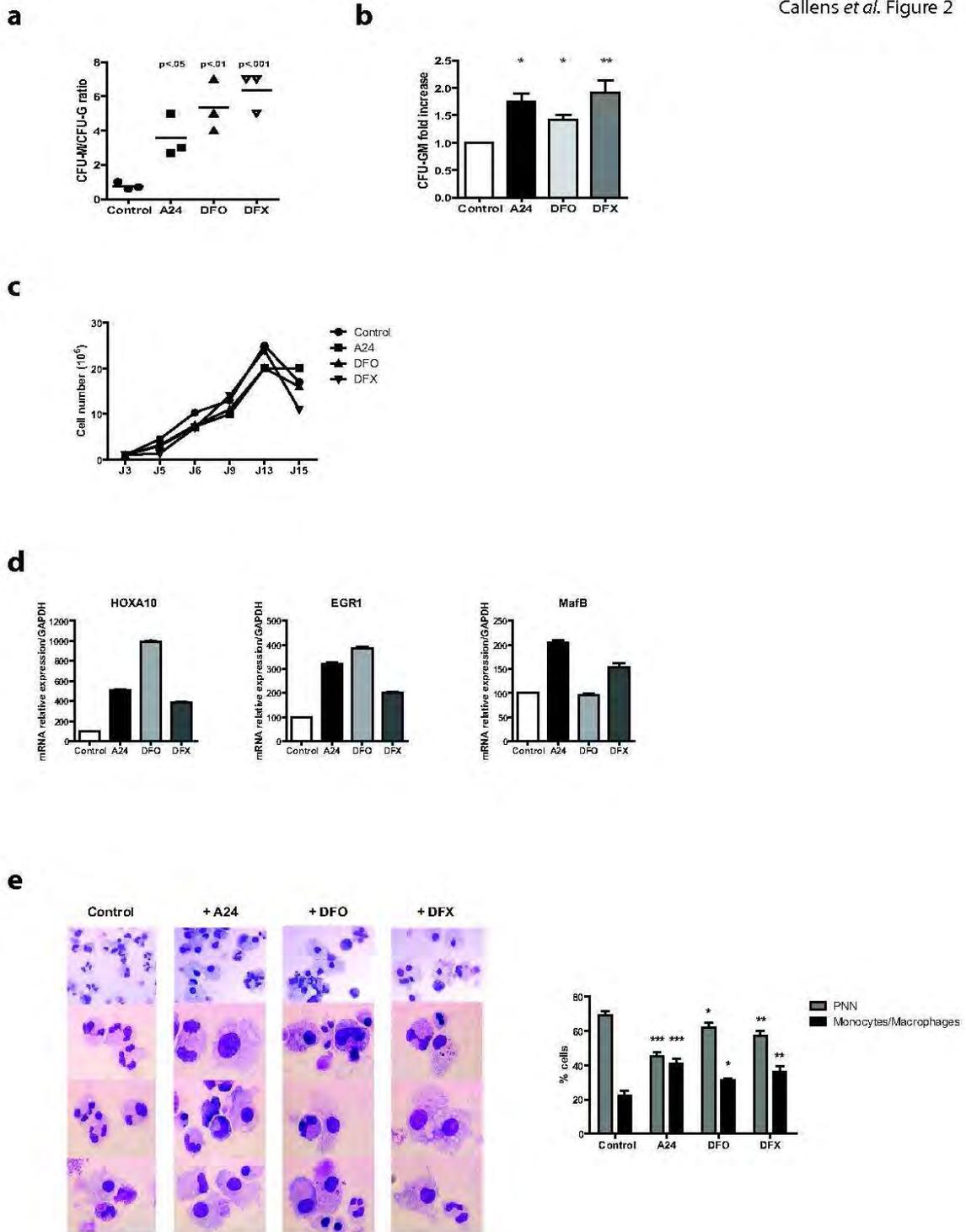


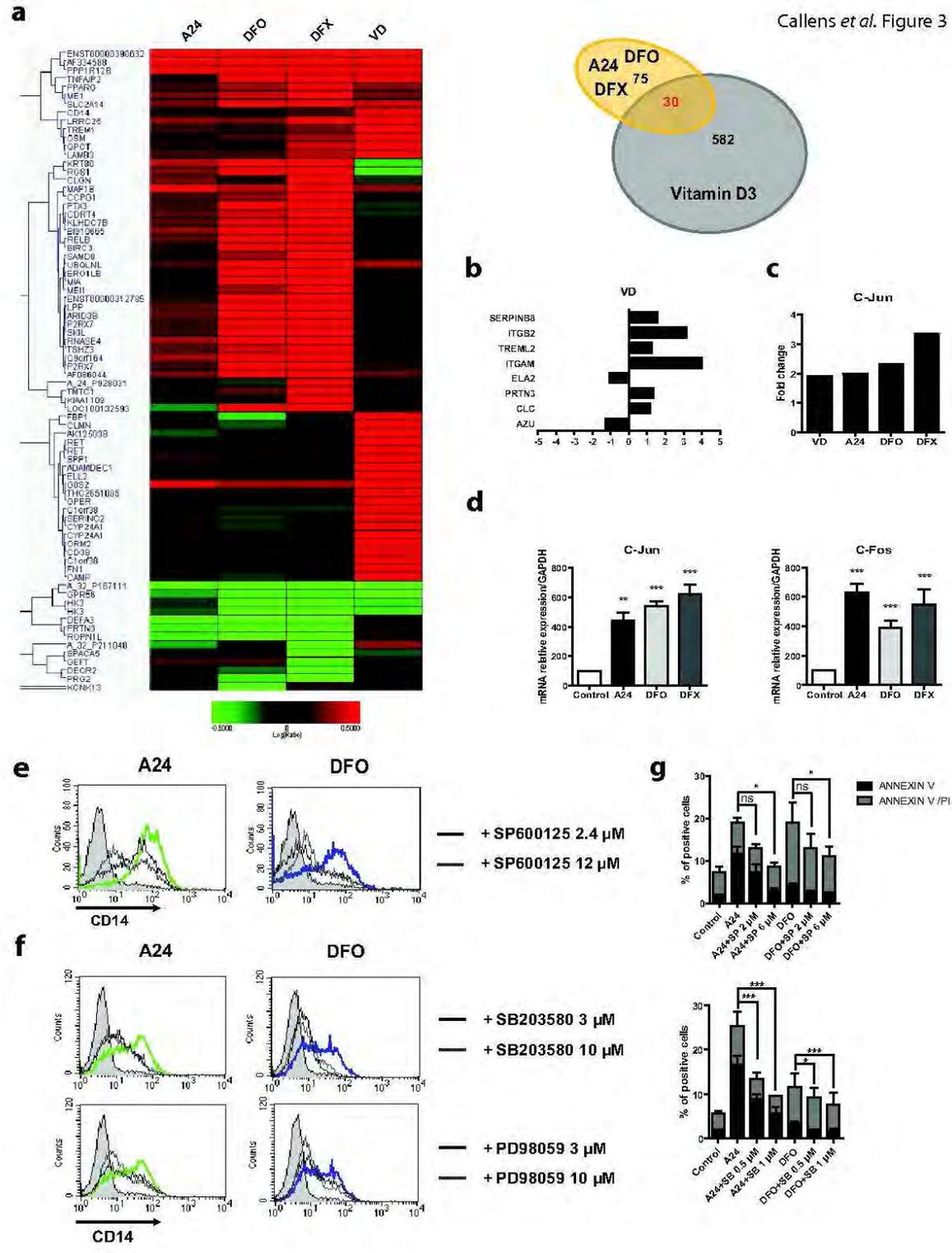
Figure 1: Iron deprivation induces monocytic differentiation in AML cells

**(a)** Agilent microarray unsupervised analysis of HL60 cells following 48-h exposure to 10 µg/ml of anti-TfR1 antibody (mAb A24), 5 µM deferoxamine (DFO) or 3 µM deferasirox (DFX). The color intensity represents the ratio of expression in drug-treated compared with control cells. The relative overexpression and underexpression compared with controls are shown in red and green, respectively (left). A Venn diagram of genes induced by iron deprivation (right). The diagram shows that only a subset of genes (105) have a shared altered expression between the different iron deprivation treatments in contrast to many genes (1094) that are altered by the iron chelators, DFO and DFX. Genes with an intensity >50 and a *p* value <0.001 were considered relevant. **(b)** Histograms representing the variation (fold change relative to untreated cells) of genes expressed in differentiated cells. A24 and the iron chelators up-regulated monocyte/macrophage-specific genes and down-regulated myelocytic-specific genes. Up-regulation is represented on the positive scale, and down-regulation is indicated on the negative scale. **(c)** The fold increase of CD14 and CD11b expression following flow cytometry (MFI relative to untreated cells) in HL60 (dark gray) and U937 (light gray) cells treated with A24 (10 µg/ml), DFO (5 µM) or DFX (3 µM) for 72 h (mean ± SEM, *n*=3). **(d)** MGG-stained cytopins. HL60 cells: the control cells show an immature myeloblastic phenotype: a high nucleus-to-cytoplasm ratio, a hyperbasophilic cytoplasm and numerous azurophilic granules. The A24- or iron chelator-treated cells show a decrease in the nucleus-to-cytoplasm ratio, the loss of granules and cytoplasmic basophilia and irregular cytoplasmic contours, all typical of mature monocytes. Magnification: x 630. **(e)** CD14 expression in HL60 cells treated with A24 (continuous bold green line), DFO and DFX (continuous bold blue line) in the presence or absence of 5 µM FeCl<sub>3</sub> (discontinuous thin line) for 72 h. The filled histograms represent staining with the isotype control antibody. One representative experiment of three experiments is shown. **(f)** CD14 and CD11b expression in blasts from AML patients treated with A24 and DFO for 72 h. The expression of the differentiation markers was normalized by calculating the fold increase of the MFI relative to the control cells. The filled symbols represent the M0/M1/M2 AML subtypes, and the M4/M5 subtypes are empty symbols. The mean of the eight patients is presented.



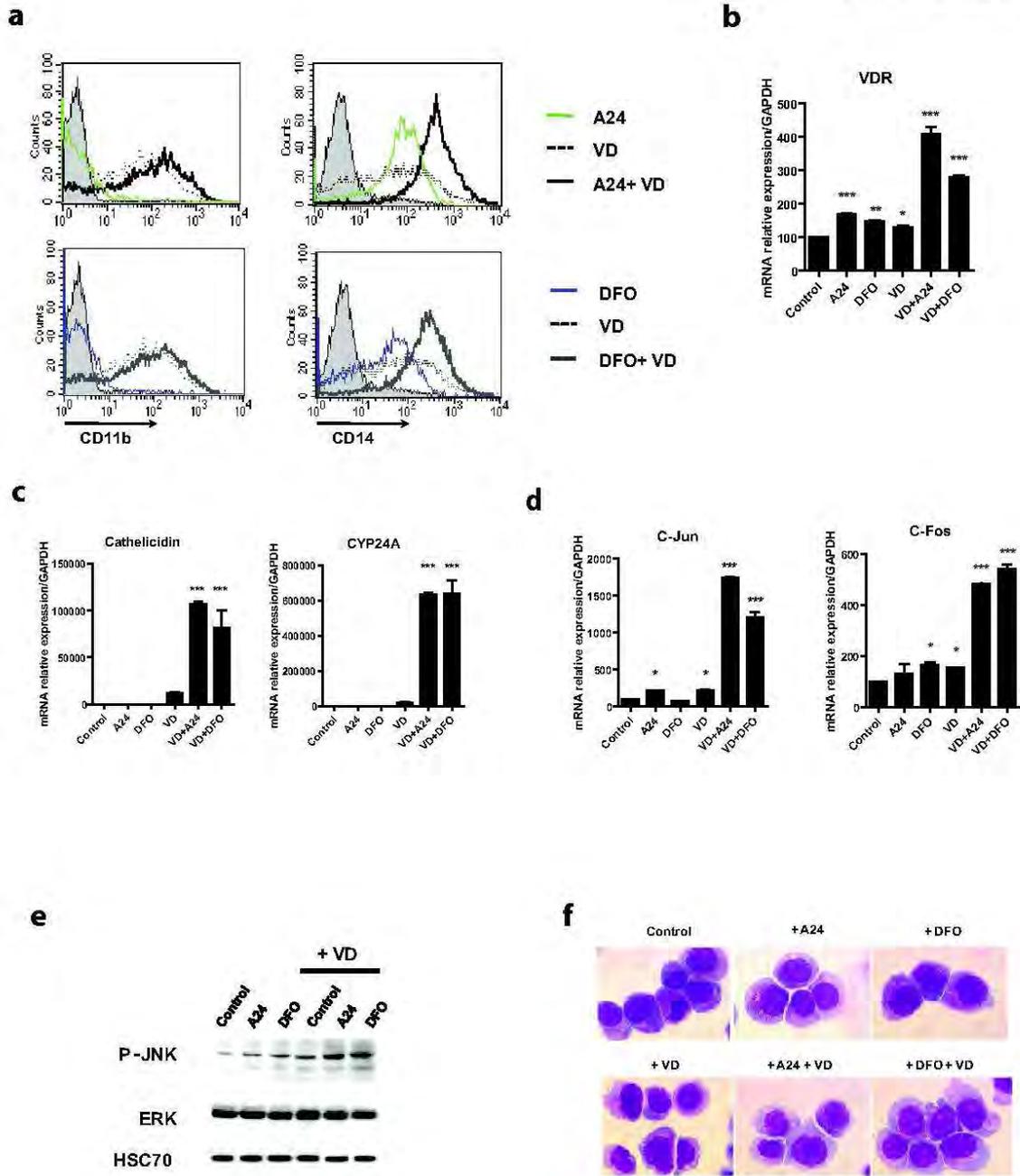
**Figure 2 : Iron deprivation induces the differentiation of primary progenitors into monocytes.**

CD34<sup>+</sup> cells cultured in the presence of a cocktail of cytokines (SCF, IL-3, G-CSF and GM-CSF) were treated with A24 (10 µg/ml), DFO (5 µM) or DFX (3 µM). The ratio **(a)** and the fold increase **(b)** of CFU-GM and the CFU-M/CFU-G from semi-solid cultures of CD34<sup>+</sup> cord blood cells treated with A24 and iron chelators (DFO and DFX). Colonies of each lineage were counted after 14 days (mean ± SEM, *n*=3). **(c)** The cell number and viability, measured using Trypan blue dye exclusion, were evaluated during culture. One representative experiment of three is shown. All counts were performed in triplicate. **(d)** After 48 h of culture, the mRNA expression of *HOXA10*, *EGR1* and *MAFB* were quantified by qRT-PCR and normalized to the expression of *GAPDH*. (mean ± SEM, *n*=3). **(e)** Representative photos taken at the end of culture (day 18) are shown. Neutrophil polymorphonuclear cells are present in the majority of the control cultures, whereas monocytes and macrophages are predominantly present under iron deprivation conditions. The histograms represent the percentage of leukocyte populations from May-Grünwald Giemsa (MGG) colored cytopins at day 18 (mean ± SEM, three counts of 100 cells were made).



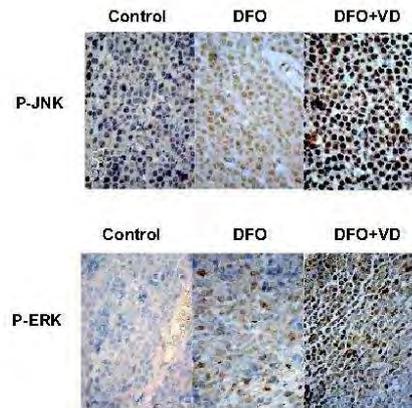
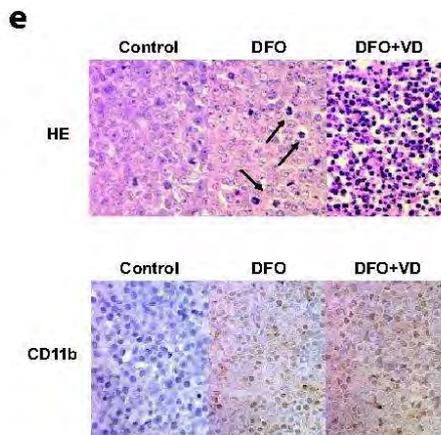
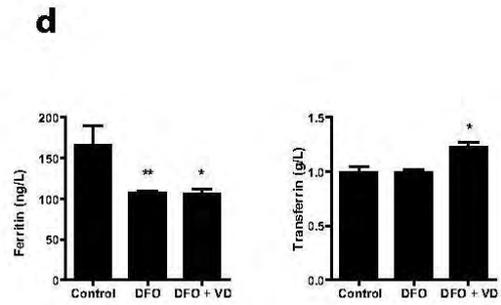
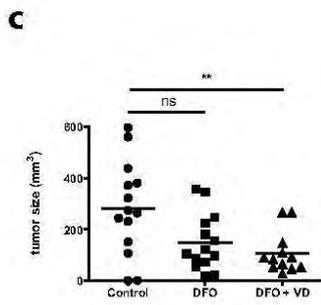
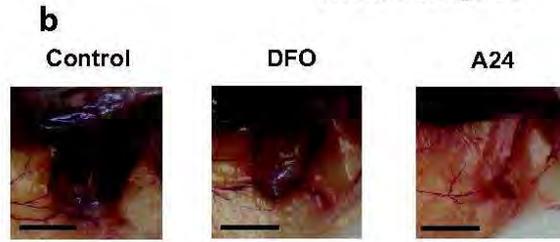
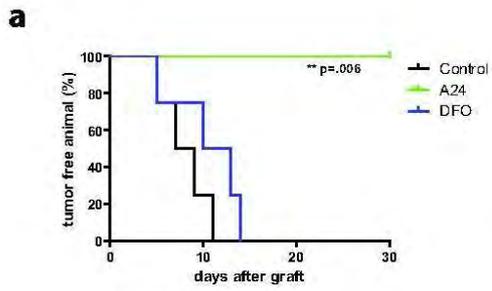
**Figure 3: Cellular differentiation induced by iron deprivation is dependent on the activation of the MAPK pathways**

**(a)** Hierarchical gene clustering by unsupervised microarray analysis in HL60 cells treated with VD (250 nM) or iron chelating agents (10 µg/ml A24, 5 µM DFO or 3 µM DFX). Only genes with a fold change >4 and a *p* value <10<sup>-15</sup> are shown **(left)**. A Venn diagram demonstrating that among the 105 genes that were specifically induced by iron deprivation, 30 were modified by treatment with VD **(right)**. **(b)** Histograms representing the variation of expression (fold change relative to untreated cells) of genes found in mature monocytes (up-regulated) or neutrophils (down-regulated) that were previously modified by A24 and the iron chelators; these genes are similarly regulated by VD treatment. Up-regulation of gene transcription is represented on the positive scale, and down-regulation is shown on the negative scale. **(c)** Histograms representing fold change in *c-Jun* expression following treatment with VD or iron deprivation. **(d)** *c-Fos* and *c-Jun* mRNA level evaluated by quantitative RT-PCR and normalized to *GAPDH* mRNA in HL60 cells treated for 48 h with the indicated agents (A24, 10 µg/ml; DFO, 5 µM or DFX, 3 µM; mean ± SEM, *n*=4). **(e)** CD14 expression on HL60 cells cultured in the presence or absence of A24 or DFO (bold) and treated with a JNK inhibitor (SP600125) at 2.4 µM (black thin lines) or 12 µM (gray thin lines) or mock treated for 72 h. Filled histograms represent staining with the isotype control antibody. One representative experiment of three experiments is shown. **(f)** CD14 expression on HL60 cells cultured in the presence or absence of A24 or DFO (bold) and treated with a p38 inhibitor (SB203580) or a ERK inhibitor (PD98059) at 3 µM (black thin lines) or 10 µM (gray thin lines) or mock treated for 72 h. Filled histograms represent staining with the isotype control antibody. One representative experiment of three experiments is shown. **(g)** Histograms representing early and late apoptosis/necrosis using flow cytometry with annexin V-FITC/PI labeling. HL60 cells were cultured in the presence or absence of A24 (10 µg/ml) or DFO (5 µM) and treated with 2 or 6 µM JNK inhibitor (SP600125, SP), 0.5 or 1 µM p38 inhibitor (SB203580, SB) or mock treated (mean ± SEM, *n*=3).



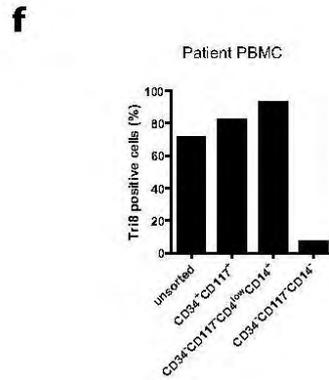
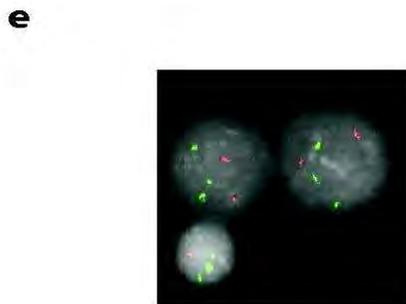
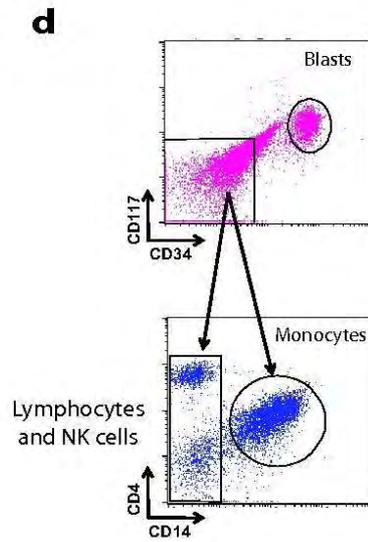
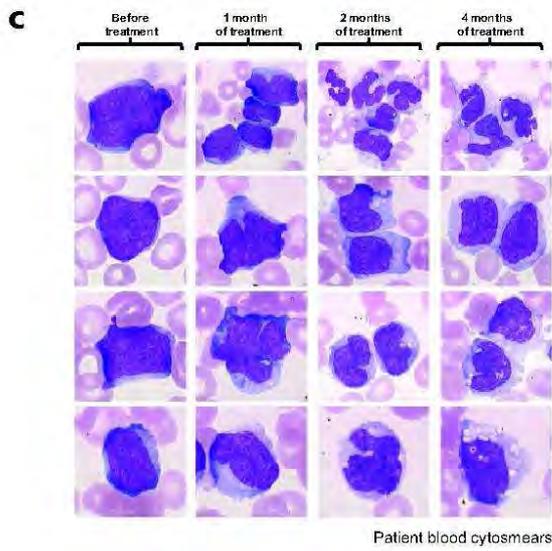
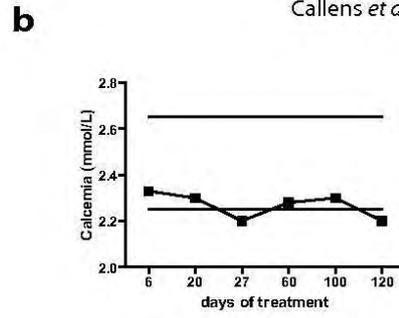
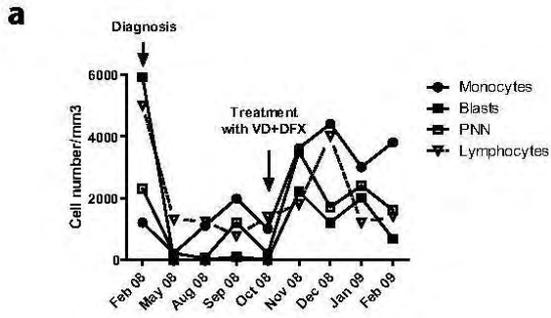
**Figure 4: VD synergizes with iron deprivation agents to activate the Jun pathway and induce cellular differentiation.**

**(a)** Flow cytometric analysis of CD14 and CD11b expression on HL60 cells treated with 10 µg/ml A24 or 5 µM DFO (continuous thin line), with 250 nM VD (discontinuous thin line) or a combination of VD and iron-chelating agents (continuous bold line) for 72 h. The filled histograms represent staining with the isotype control antibody. One representative experiment of three is shown. **(b)** The *VDR* mRNA level, evaluated by quantitative RT-PCR and normalized to *GAPDH*, in HL60 cells treated for 6 h with the indicated agents (A24, 10 µg/ml ; DFO, 5 µM; or VD, 250 nM) (mean ± SEM, *n*=4). **(c)** The mRNA level of *Cathelicidin* and *CYP24A*, evaluated by quantitative RT-PCR and normalized to *GAPDH*, in HL60 cells treated for 6 h with the indicated agents (A24, 10 µg/ml ; DFO, 5 µM; or VD, 250 nM) (mean ± SEM, *n*=4). **(d)** The mRNA level of *c-Fos* and *c-Jun* genes, evaluated by quantitative RT-PCR and normalized to *GAPDH*, in HL60 cells treated for 16 h with A24, DFO and VD as described above (mean ± SEM, *n*=4). **(e)** Serum-starved HL60 cells were incubated with A24 (10 µg/ml) or DFO (3 µM) and treated with VD (250 nM) or mock treated for 30 min at 37°C. Whole-cell extracts from the treated cells were analyzed by immunoblot, demonstrating the increased phosphorylation of JNK when VD is combined with A24 or DFO. HSC70 and total ERK were used as loading controls. **(f)** HL60 cells were incubated with A24 (10 µg/ml) or DFO (3 µM) and treated with VD (250 nM) or mock treated for 72 h. Cytospins for the treated cells were stained with MGG. Monocytic differentiation is observed with the loss of granulation and basophilia, vacuole appearance and cytoplasm enlargement.



**Figure 5: Anti-tumor effect of iron deprivation combined with Vitamin D in AML cells in a animal model**

**(a)** Kaplan-Meier plot of the percentage of tumor-free mice among mice treated with vehicle (Control), A24 (single intravenous dose of 40 mg/kg) and DFO (20 mg five times/week) after subcutaneous xenograft with HL60 cells. The *p* value was determined using the log rank test. **(b)** Representative photographs of xenografted tumors from figure 5a. The scale bars represent 10 mm. **(c)** The tumor size measured at day 25 in xenografted mice. Individual tumor sizes are plotted. The bars represent the mean of each group (*n*=12 in the control group, *n*=14 in the DFO group and *n*=13 in the DFO+VD group). **(d)** Serum ferritin and transferrin levels in xenografted mice. Twenty-five days after the engraftment, the mice were euthanized, and serum was collected for biochemical analysis. **(e)** Sections of tumors from mice injected with vehicle, DFO and DFO+VD were stained with hematoxylin and eosin (H&E) or CD11b-, p-ERK- or p-JNK-specific antibodies. The arrowheads indicate apoptosis. (Magnification: x 400).



**Figure 6: Iron chelation therapy in combination with VD treatment induced blast differentiation in a refractory AML/MDS patient**

**(a)** Histograms representing the blood counts during treatment. The diagnosis and the beginning of the combination therapy are represented with arrowheads. **(b)** Plasma calcium concentration during the treatment. **(c)** MGG-stained blood cytosmeared during treatment. At diagnosis, undifferentiated blasts were predominantly observed in MGG-stained blood cytosmeared. One month after beginning treatment, the blasts started to present signs of monocytic differentiation, such as nuclear deformation, cytoplasm enlargement and the presence of vacuoles. After 3 months of treatment, undifferentiated blasts were replaced by “monocytoid” blasts and pro-monocytes. After 4 months, some monoblasts were still detected, but mature monocytes were predominantly observed. **(d)** The differentiation potential of blasts treated with combination therapy was evaluated in circulating cells after 3 months of treatment. PBMCs were isolated, and the cell populations were sorted as follows: blasts ( $CD34^+CD117^+$ ); monocytes ( $CD34^-CD117^-CD4^{low}CD14^+$ ); and lymphocytes and NK cells ( $CD34^-CD117^-CD14^-$ ). The cells were further processed for cytogenetic analysis. **(e)** FISH analysis. Representative images of chromosomes 8 (green) and 12 (red) probed by fluorescent *in situ* hybridization demonstrating the trisomy 8 present in the monocytes. **(f)** Histogram of the percentage of trisomy 8 positive cells in sorted fractions from supplementary figure 8c, demonstrating that the monocytes, but not the lymphocytes and NK cells, originated from the blast pool.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Clinical samples and cell lines**

Peripheral blood cells were obtained from AML patients and healthy donors after obtaining their written informed consent (please refer to supplementary table 2 for additional information). Peripheral blood was collected at the initial diagnosis prior to the administration of treatment. Mononuclear cells were separated by Ficoll-hypaque (PAA laboratories) density centrifugation and resuspended in IMDM (Invitrogen) supplemented with 15% fetal calf serum (FCS; Hyclone), 100 ng/ml Stem Cell Factor (SCF), 10 ng/ml Interleukin 3 (IL-3) and 25 ng/ml FLT3-L (all purchased from R&D Systems). The HL60 and U937 cell lines were a kind gift from J.M. Cayuela (Saint-Louis Hospital, Paris). Cells were cultured in RPMI-1640 medium (Invitrogen) supplemented with 5% FCS and antibiotics.

### **Cell treatment and proliferation assays**

Deferasirox was provided by Novartis. VP16, DFO, 25-OH-VitaminD3 (25-hydroxycholecalciferol) (VD) and FeCl<sub>3</sub> were purchased from Sigma-Aldrich. The mAb, A24, was produced and purified as described previously (14). The inhibitors of JNK (SP600125), ERK (PD98059) and p38 (SB203580) were purchased from Santa Cruz Biotechnology.

For the proliferation assays, the HL60 cell line was resuspended in RPMI-1640 medium with 5% FCS, whereas the patient blasts were resuspended in IMDM with 15% BIT 9500 (Stem Cell Technologies). The cells were plated in triplicate at  $2.5 \times 10^4$  cells per well in 96-well tissue culture plates (Falcon). Proliferation was measured as described previously (16).

### **Cytogenetic Analysis**

Fluorescence in situ hybridization (FISH) was performed using standard protocols with specific centromeric probes for chromosome 8 (pZ8.4) and chromosome 12 (pBR12, kindly provided by Pr M. Rocchi, University of Bari, Italy), using as control.

### **RNA isolation, real-time quantitative PCR and transcriptome analysis**

Total RNA was extracted using Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel). Following DNase treatment, first-strand cDNA was synthesized using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen). Quantitative real-time PCR was performed using a Chromo-IV PCR System (MJ Research), and the PCR products were quantified using SybrGreen Technology (Jumpstart Mastermix, Sigma Aldrich). The results of

the real-time quantitative PCR were analyzed using the delta-delta Ct method (38). The complete list of primer sequences is available in the supplementary data section, table 4.

For the microarrays, the Agilent 44 K Whole Human Genome (G4112A) long (60 bp) oligonucleotide microarray and the dual-color analysis method were used with probes from the treated samples and from reference RNA that were differentially labeled with cyanine 5 and cyanine 3. These microarrays have 44,290 features with 41,000 distinct oligonucleotides belonging to 33,715 sequences defined by their accession number. cRNA from each treated sample was labeled with cyanine 3 (Cy3)-cytidine triphosphate (CTP) and the untreated HL60 RNA reference pool with cyanine 5 (Cy5)-CTP for direct comparison. Reverse transcription, linear amplification, cRNA labeling and cRNA purification were performed with the Agilent linear amplification kit. The microarray data were mainly analyzed with Resolver software (Rosetta Inpharmatics). All data were filtered to eliminate low-intensity values under 50 arbitrary units for both colors.

### **Tumor xenografts**

For the prevention of tumor establishment,  $5 \times 10^6$  HL60 cells were mixed with Matrigel (1:1, V/V) and injected subcutaneously into 8- to 10-week-old female athymic nude mice. The mice were then injected i.p. with A24 (40 mg/kg on day 1), DFO (20 mg/day, 5–7 times/week), VD (1  $\mu$ g, twice per week) or PBS as a vehicle control. The tumor growth was measured as previously described (16).

### **Immunohistochemistry**

Serial sections (3  $\mu$ m) in paraffin blocks were deparaffinized in xylene and hydrated in a graded series of alcohol. Staining was performed using the Lab Vision Immunohistochemical Autostainer (Lab Vision Corporation, Fremont, CA) with primary antibodies against CD11b (Sigma-Aldrich, 1:200), p-ERK and p-JNK (Cell Signaling, 1:200), biotinylated anti-Ig and streptavidin-peroxidase. The antibody binding was developed in PBS with DAB (0.05%) and 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The images were obtained using a Leica microscope (DM-2000) equipped with a digital camera (DFC320, Leica) and IM50 software.

### **Statistical analysis**

The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software. We used the Student's *t*-test or the Mann-Whitney test to compare two groups, and multigroup comparisons were made using a one-way ANOVA followed by a post-hoc Bonferroni test. We used the Kruskal-Wallis test followed by a post-hoc Dunn test for non-parametric comparisons, where indicated. To compare tumor-free animal curves, the Log-rank test was used.

The results were considered statistically significant at a  $p$  value less than 0.05 (\*), less than 0.01 (\*\*), or less than 0.001 (\*\*\*).

### **Cord blood cell cultures and methylcellulose colony-forming assays**

CD34<sup>+</sup> cord blood cells were isolated by immunomagnetic separation (Miltenyi Biotech) and cultured in IMDM supplemented with 15% BIT 9500 (Stem Cell Technologies), SCF (100 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml), granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF, 25 ng/ml) and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF, 10 ng/ml) for myelomonocytic differentiation (all cytokines were purchased from R&D Systems).

For colony-forming assays,  $1 \times 10^3$  CD34<sup>+</sup> cells were plated in quadruplicate in semi-solid methylcellulose medium (H4434, Stem Cell Technologies) in the presence or absence of A24 (10 µg/ml), DFO (5 µM) or DFX (3 µM). Colonies were identified and scored at day 14 using an inverted microscope.

### **Analysis of cellular differentiation and apoptosis**

Cellular differentiation was evaluated by morphology with May Grünwald Giemsa (MGG) staining and by the expression of CD11b (IM2581U, Beckman Coulter) and CD14 (A07765, Beckman Coulter) by flow cytometry (FACSCalibur, Becton-Dickinson). Cell death was evaluated by using the annexin-V/propidium iodide (PI) double staining kit (BD Biosciences, Pharmingen).

### **Immunoblotting**

Whole cell extracts were prepared as described previously (Amir-Moazami *et al.*, J Biol Chem, 2008). Briefly, cell pellets ( $1 \times 10^7$  cells) were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and then resuspended in 1 ml of lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM h-glycerophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 µg/ml leupeptin and 1 µg/ml aprotinin). The protein concentration was determined using the BCA method (Pierce) and an equal amount of SDS sample buffer containing 150 mM Tris-HCl (pH 6.8), 30% glycerol, 3% SDS, 1.5 mg/ml bromphenol blue and 100 mM DTT was then added to each sample. For immunoblotting, 40 µg protein was separated in 4-12% SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane. The blots were first probed with an anti-phospho p-ERK (Thr202/Tyr204 #4377), p-JNK (#9251) or p-p38 (#4631) antibody (all from Cell Signaling, Beverly, MA). The membranes were stripped, dried and probed with an antibody against total ERK (#9102 Cell

Signaling) or HSC70 (sc-71270) (Santa Cruz Biotechnology). The protein bands were visualized using a chemiluminescence system.

## REFERENCES

1. Lowenberg, B., J.R. Downing, and A. Burnett. 1999. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 341:1051-1062.
2. Kelly, L.M., and D.G. Gilliland. 2002. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3:179-198.
3. Gilliland, D.G., C.T. Jordan, and C.A. Felix. 2004. The molecular basis of leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 80-97.
4. Frohling, S., C. Scholl, D.G. Gilliland, and R.L. Levine. 2005. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol* 23:6285-6295.
5. Renneville, A., C. Roumier, V. Biggio, O. Nibourel, N. Boissel, P. Fenaux, and C. Preudhomme. 2008. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* 22:915-931.
6. Ravandi, F., A.K. Burnett, E.D. Agura, and H.M. Kantarjian. 2007. Progress in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer* 110:1900-1910.
7. Trowbridge, I.S., and D.A. Shackelford. 1986. Structure and function of transferrin receptors and their relationship to cell growth. *Biochem Soc Symp* 51:117-129.
8. Lim, B.C., H.J. McArdle, and E.H. Morgan. 1987. Transferrin-receptor interaction and iron uptake by reticulocytes of vertebrate animals--a comparative study. *J Comp Physiol [B]* 157:363-371.
9. Daniels, T.R., T. Delgado, J.A. Rodriguez, G. Helguera, and M.L. Penichet. 2006. The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin Immunol* 121:144-158.
10. Faulk, W.P., B.L. Hsi, and P.J. Stevens. 1980. Transferrin and transferrin receptors in carcinoma of the breast. *Lancet* 2:390-392.
11. Gatter, K.C., G. Brown, I.S. Trowbridge, R.E. Woolston, and D.Y. Mason. 1983. Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. *J Clin Pathol* 36:539-545.
12. Trowbridge, I.S., and D.L. Domingo. 1981. Anti-transferrin receptor monoclonal antibody and toxin-antibody conjugates affect growth of human tumour cells. *Nature* 294:171-173.
13. Daniels, T.R., T. Delgado, G. Helguera, and M.L. Penichet. 2006. The transferrin receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells. *Clin Immunol* 121:159-176.
14. Moura, I.C., M.N. Centelles, M. Arcos-Fajardo, D.M. Malheiros, J.F. Collawn, M.D. Cooper, and R.C. Monteiro. 2001. Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. *J Exp Med* 194:417-425.
15. Moura, I.C., Y. Lepelletier, B. Arnulf, P. England, C. Baude, C. Beaumont, A. Bazarbachi, M. Benhamou, R.C. Monteiro, and O. Hermine. 2004. A neutralizing monoclonal antibody (mAb A24) directed against the transferrin receptor induces apoptosis of tumor T lymphocytes from ATL patients. *Blood* 103:1838-1845.
16. Lepelletier, Y., V. Camara-Clayette, H. Jin, A. Hermant, S. Coulon, M. Dussiot, M. Arcos-Fajardo, C. Baude, D. Canionni, R. Delarue, N. Brousse, P. Benaroch, M. Benhamou, V. Ribrag, R.C. Monteiro, I.C. Moura, and O. Hermine. 2007. Prevention of mantle lymphoma tumor

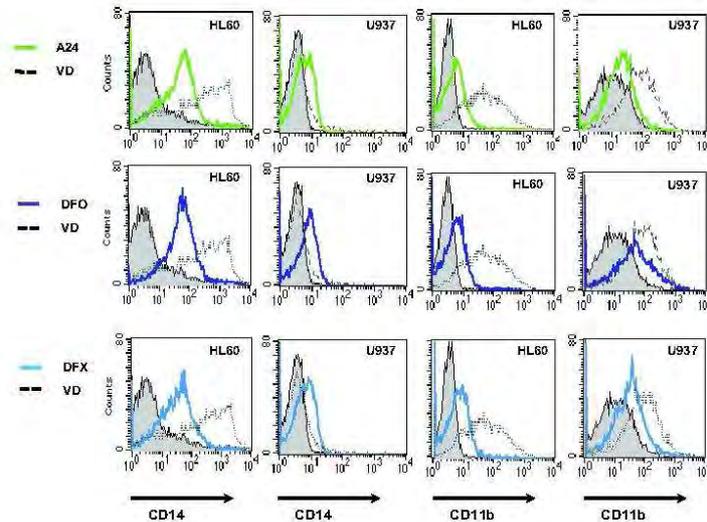
- establishment by routing transferrin receptor toward lysosomal compartments. *Cancer Res* 67:1145-1154.
17. Callens, C., I.C. Moura, Y. Lepelletier, S. Coulon, A. Renand, M. Dussiot, D. Ghez, M. Benhamou, R.C. Monteiro, A. Bazarbachi, and O. Hermine. 2008. Recent advances in adult T-cell leukemia therapy: focus on a new anti-transferrin receptor monoclonal antibody. *Leukemia* 22:42-48.
  18. Whitnall, M., J. Howard, P. Ponka, and D.R. Richardson. 2006. A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14901-14906.
  19. Richardson, D.R., D.S. Kalinowski, S. Lau, P.J. Jansson, and D.B. Lovejoy. 2008. Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumour agents. *Biochim Biophys Acta*
  20. Richardson, D., P. Ponka, and E. Baker. 1994. The effect of the iron(III) chelator, desferrioxamine, on iron and transferrin uptake by the human malignant melanoma cell. *Cancer Res* 54:685-689.
  21. Le, N.T., and D.R. Richardson. 2004. Iron chelators with high antiproliferative activity up-regulate the expression of a growth inhibitory and metastasis suppressor gene: a link between iron metabolism and proliferation. *Blood* 104:2967-2975.
  22. Fu, D., and D.R. Richardson. 2007. Iron chelation and regulation of the cell cycle: 2 mechanisms of posttranscriptional regulation of the universal cyclin-dependent kinase inhibitor p21CIP1/WAF1 by iron depletion. *Blood* 110:752-761.
  23. Napier, I., P. Ponka, and D.R. Richardson. 2005. Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. *Blood* 105:1867-1874.
  24. Friedman, A.D. 2007. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 26:6816-6828.
  25. Sieweke, M.H., H. Tekotte, J. Frampton, and T. Graf. 1996. MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell* 85:49-60.
  26. Taghon, T., F. Stolz, M. De Smedt, M. Cnockaert, B. Verhasselt, J. Plum, and G. Leclercq. 2002. HOX-A10 regulates hematopoietic lineage commitment: evidence for a monocyte-specific transcription factor. *Blood* 99:1197-1204.
  27. Chen, Z., S.J. Chen, and Z.Y. Wang. 1994. Retinoic acid and acute promyelocytic leukemia: a model of targeting treatment for human cancer. *C R Acad Sci III* 317:1135-1141.
  28. Zhu, J., V. Lallemand-Breitenbach, and H. de The. 2001. Pathways of retinoic acid- or arsenic trioxide-induced PML/RARalpha catabolism, role of oncogene degradation in disease remission. *Oncogene* 20:7257-7265.
  29. Wang, Z.Y., and Z. Chen. 2008. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* 111:2505-2515.
  30. Tallman, M.S. 1996. Differentiating therapy in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 10:1262-1268.
  31. Ferrero, D., E. Campa, C. Dellacasa, S. Campana, C. Foli, and M. Boccadoro. 2004. Differentiating agents + low-dose chemotherapy in the management of old/poor prognosis patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 89:619-620.

32. Srivastava, M.D., and J.L. Ambrus. 2004. Effect of 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> analogs on differentiation induction and cytokine modulation in blasts from acute myeloid leukemia patients. *Leuk Lymphoma* 45:2119-2126.
33. Deeb, K.K., D.L. Trump, and C.S. Johnson. 2007. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 7:684-700.
34. Himes, S.R., D.P. Sester, T. Ravasi, S.L. Cronau, T. Sasmono, and D.A. Hume. 2006. The JNK are important for development and survival of macrophages. *J Immunol* 176:2219-2228.
35. Wang, Q., X. Wang, and G.P. Studzinski. 2003. Jun N-terminal kinase pathway enhances signaling of monocytic differentiation of human leukemia cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Cell Biochem* 89:1087-1101.
36. Johnson, G.L., and R. Lapadat. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298:1911-1912.
37. Lopez-Bergami, P., C. Huang, J.S. Goydos, D. Yip, M. Bar-Eli, M. Herlyn, K.S. Smalley, A. Mahale, A. Eroshkin, S. Aaronson, and Z. Ronai. 2007. Rewired ERK-JNK signaling pathways in melanoma. *Cancer Cell* 11:447-460.
38. Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.

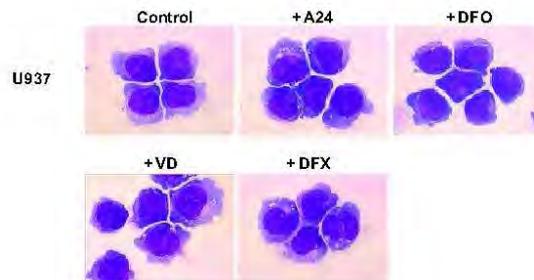
## SUPPLEMENTARY FIGURES

**a**

Callens *et al.* Supplementary Figure 1



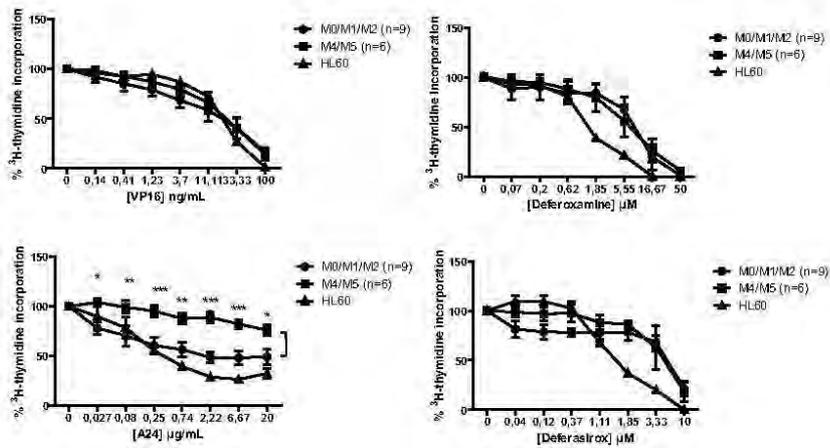
**b**



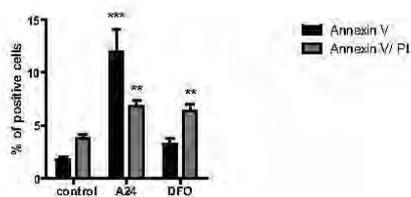
### Supplementary Figure 1. Iron deprivation induces morphological and phenotypical modifications of monocytic cells related to cellular differentiation.

HL60 and U937 cells were cultured in the presence of A24 (10  $\mu\text{g/ml}$ ), DFO (5  $\mu\text{M}$ ), DFX (3  $\mu\text{M}$ ) or VD (250 nM) for 72 h. **(a)** Flow cytometric analysis of the expression of CD14 and CD11b. A24-treated cells are represented by the continuous bold green line, whereas DFO- or DFX- and VD-treated cells are represented by the continuous bold blue line and discontinuous thin line, respectively. One representative overlay of three independent experiments is shown. The filled histograms represent staining with the isotype control antibody. **(b)** MGG-stained cytopspins. U937 cells: the control cells show an immature phenotype with a high nucleus-to-cytoplasm ratio and a hyperbasophilic cytoplasm. In contrast, A24- or iron chelator (DFO and DFX) treated cells show a decreased nucleus-to-cytoplasm ratio, the loss of cytoplasm basophilia and irregular cytoplasmic contours, all characteristics that are typical of mature monocytes. These results are similar to the positive control (VD treatment). Magnification: x 630.

**a**

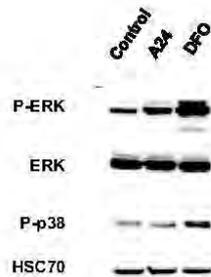


**b**



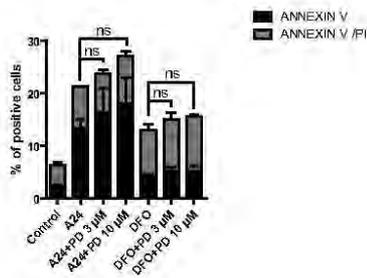
**Supplementary Figure 2. Iron deprivation inhibits AML cell proliferation.**

**(a)** Fresh AML blasts or HL60 cells were cultured with increasing concentrations of A24 (0–20 μg/ml), DFO (0–50 μM), DFX (0–10 μM) or VP16 (0–100 ng/ml) for 72 h, before [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation was measured. The mean ± SEM of grouped M0/M1/M2 (n=6) or M4/M5 (n=9) subtype patients is shown. **(b)** HL60 cells were cultured in the presence or absence of A24 or DFO for 72 h. Early and late apoptosis was evaluated by flow cytometry using annexin V-FITC/PI labeling (mean ± SEM, n=3).



**Supplementary Figure 3. Cellular differentiation induced by iron deprivation is dependent on the MAPK pathway.**

Serum-starved HL60 cells were incubated with A24 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) or DFO (3  $\mu\text{M}$ ) for 30 min at 37°C. Whole-cell extracts were analyzed by immunoblot, demonstrating the phosphorylation of ERK (p-ERK) and p38 (p-p38). One representative experiment is shown. HSC70 and ERK were used as loading controls.



**Supplementary Figure 4. Apoptosis induction by iron deprivation is not blocked by an ERK inhibitor.**

HL60 cells were cultured in the presence or absence of A24 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) or DFO (5  $\mu\text{M}$ ) and treated with the ERK inhibitor PD98059 (3 and 10  $\mu\text{M}$ ) or mock treated. The cells were harvested after 72 h and early and late apoptosis/necrosis was evaluated by flow cytometry using annexin V-FITC/PI labeling (mean  $\pm$  SEM,  $n=3$ ).

**SUPPLEMENTARY TABLES**

**Supplementary Table 1: List of the common genes induced by iron deprivation.**

Sequence Name	Accession Number	Fold Change	Sequence Name	Accession Number	Fold Change
AF086044	AF086044	4,03	RETN	NM_020415	2,07
RGS1	NM_002922	3,91	PGDS	NM_014485	2,05
BI910665	BI910665	3,88	BF213738	BF213738	2,04
RNASE4	NM_002937	3,84	IQCD	NM_138451	1,99
GPR34	NM_001097579	3,64	C19orf59	NM_174918	1,98
KLHDC7B	NM_138433	3,44	JAZF1	NM_175061	1,98
RELB	NM_006509	3,38	SULF2	NM_018837	1,95
BCL3	NM_005178	3,36	CCL5	NM_002985	1,95
ARID3B	NM_006465	3,29	ANXA2	NM_001002857	1,94
WIPI1	NM_017983	3,26	PMP22	NM_000304	1,92
P2RX7	NM_002562	3,21	DOCK10	NM_014689	1,91
SLC2A14	BC060766	3,16	ITGAM	NM_000632	1,84
PTX3	NM_002852	3,14	KDELC1	NM_024089	1,83
TSHZ3	NM_020856	3,12	E2F8	NM_024680	1,82
PSCDBP	NM_004288	3,06	C18orf24	NM_001039535	1,78
FLOT1	NM_005803	3,05	C1orf96	NM_145257	1,77
ME1	NM_002395	3,03	TNFSF10	NM_003810	1,77
JUN	NM_002228	3,02	CD300A	NM_007261	1,76
CDRT4	NM_173622	2,92	ITGB2	NM_000211	1,61
EMP1	NM_001423	2,83	CD74	NM_001025158	-1,75
TREML2	NM_024807	2,82	DPY19L2P4	AK098759	-1,76
ANKRD22	NM_144590	2,78	SLPI	NM_003064	-1,87
DDIT3	NM_004083	2,68	SESN3	NM_144665	-1,89
CD70	NM_001252	2,67	F13A1	NM_000129	-1,94
OSBPL11	NM_022776	2,65	LY75	NM_002349	-1,96
CCNG2	NM_004354	2,64	AK026140	AK026140	-1,97
CCNG2	NM_004354	2,62	UBE2E1	NM_003341	-1,98
PPARG	NM_138711	2,59	OPN3	NM_014322	-2,00
CDKN2D	NM_001800	2,58	IRF8	NM_002163	-2,03
NFIL3	NM_005384	2,55	ALDOC	NM_005165	-2,05
PIP5K1B	NM_003558	2,48	C5orf20	NM_130848	-2,07
ARRDC3	NM_020801	2,48	AK001829	AK001829	-2,11
RGS2	NM_002923	2,46	CSTF2T	NM_015235	-2,11
LRRC25	NM_145256	2,39	CHI3L1	NM_001276	-2,12
FLOT1	NM_005803	2,37	GPR56	NM_201525	-2,16
SORT1	NM_002959	2,36	AP1S3	NM_001039569	-2,18
A_23_P57836	A_23_P57836	2,34	SLPI	NM_003064	-2,23
PIM1	NM_002648	2,34	CXorf21	NM_025159	-2,25
CCPG1	AF011794	2,34	KIT	NM_000222	-2,29
MCTP1	AK025997	2,33	MIRHG1	BC040320	-2,38
PCGF5	NM_032373	2,32	MS4A6A	NM_152852	-2,39
SLC26A11	NM_173626	2,32	MS4A6A	NM_022349	-2,43
TREML2	NM_024807	2,30	SLC2A5	NM_003039	-2,48
NLRC4	NM_021209	2,27	PRG3	NM_006093	-2,62
CCL2	NM_002982	2,25	PLD4	NM_138790	-2,65
GAS7	NM_201433	2,24	CLC	NM_001828	-2,65
CD58	NM_001779	2,23	C20orf103	NM_012261	-2,72
TMEM154	NM_152680	2,20	ROPN1L	NM_031916	-3,14
CD109	NM_133493	2,18	ROPN1L	NM_031916	-4,22

PPAP2A	NM_176895	2,18	PRTN3	NM_002777	-4,30
unknown	A_32_P122492	2,15	DEFA3	NM_005217	-8,25
PPP1R16B	NM_015568	2,14	unknown	A_32_P167111	-62,80
TES	NM_152829	2,09			

Supplementary Table 2: Characteristics of AML patients in this study.

Sex	age	FAB subtype	WBC (/mm <sup>3</sup> )	% blasts	Karyotype
M	42	M4éo	6400	21	46,XY,t(16;16)(p13;q22)[17]/46,XY [3]
M	79	M2/MDS	5000	6	43,XY,-2,add(5)(q?31),-7,del(7)(q21),-13,-14,-16,-17,+3 mar [11] / 44,idem,+8 [3] / 46,XY [4]
M	53	M1	4200	70	47, XY,+21[5]/46,XY[15]
F	49	M5	160 000	77	46,XX[20]
M	61	M1	21 000	91	46,XY,del(9)(q12q33) [16] / 46,XY [4]
F	23	M5	200 000	98	46,XX,del(2)(q3?2),t(10;11)(p12;q23)
F	59	M4	60 000	55	46,XX[20]
M	36	M2	6000	55	failure
M	51	M5	165 000	80	failure
M	76	M2	28 000	19	46,XY[20]
F	68	M2	112 000	90	46,XX[20]
F	54	M2	24 000	16	46,XX[20]
M	40	M2	9300	43	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)
M	66	M0	10 000	80	48,XY,?del(7)(q3?3q3?5),?del(20)(q1?2),+21,+21
F	64	M1	27 400	85	81-92,XXXX[17]

**Supplementary Table 3: List of genes controlled by both iron deprivation and Vitamin D.**

Sequence Name(s)	Accession number
JUN	NM_002228
LRRC25	NM_145256
RGS1	NM_002922
SLC2A14	BC060766
AF086044	AF086044
ITGAM	NM_000632
PIP5K1B	NM_003558
C19orf59	NM_174918
ANKRD22	NM_144590
ME1	NM_002395
ANXA2	NM_001002857
TNFSF10	NM_003810
SLC26A11	NM_173626
GAS7	NM_201433
SULF2	NM_018837
CD300A	NM_007261
A_23_P57836	A_23_P57836
PPARG	NM_138711
ITGB2	NM_000211
KIT	NM_000222
F13A1	NM_000129
LY75	NM_002349
GPR56	NM_201525

<b>UBE2E1</b>	<b>NM_003341</b>
<b>PLD4</b>	<b>NM_138790</b>
<b>AK026140</b>	<b>AK026140</b>
<b>MS4A6A</b>	<b>NM_022349</b>
<b>MS4A6A</b>	<b>NM_152852</b>
<b>CSTF2T</b>	<b>NM_015235</b>
<b>unknown</b>	<b>A_32_P167111</b>

**Supplementary Table 4: Sequences of the primers used for RT-PCR.**

<b>Gene</b>	<b>Forward primer sequence</b>	<b>Reverse primer sequence</b>
HOXA10	5'- ggccccttccgagagcagca -3'	5'- tggacgctgctgtaatctc -3'
MAFB	5'- atggagtatgtcaacgactt -3'	5'- cctcgagggtgtgtcttctgt -3'
EGR1	5'- gagcagccctacgagcacct -3'	5'- tcatgctcactaggccactg -3'
C-JUN	5'-ccccagcgtatctatatggaa -3'	5'-gctgtccctctccactgcaa -3'
C-FOS	5'-atgagccttctctgactcg -3'	5'-acgcacagataaggtcctcc -3'
VDR	5'-ctgaccctggagactttgac-3'	5'-ttcctctgcacttctcatc-3'
Cathelicidin	5'- gcagtcaccagaggatttgac -3'	5'-caccgcttcaccagccc -3'
CYP24A	5'-tggcttcaggagaaggaaaa -3'	5'-accagggtgctgagtgtag -3'

**Recent advances in adult T-cell leukemia therapy: focus on a new anti-transferrin receptor monoclonal antibody**

Céline Callens, Ivan Cruz Moura, Yves Lepelletier, Séverine Coulon, Amédé Renand, Michael Dussiot, David Ghez, Marc Benhamou, Renato C. Monteiro, Ali Bazarbachi, Olivier Hermine.

**Leukemia.** 2008 Jan;22(1):42-8

## REVIEW

### Recent advances in adult T-cell leukemia therapy: focus on a new anti-transferrin receptor monoclonal antibody

C Callens<sup>1,6</sup>, IC Moura<sup>2,3</sup>, Y Lepelletier<sup>1</sup>, S Coulon<sup>1</sup>, A Renand<sup>1</sup>, M Dussiot<sup>1</sup>, D Ghez<sup>4</sup>, M Benhamou<sup>2,3</sup>, RC Monteiro<sup>2,3</sup>, A Bazarbachi<sup>5</sup> and O Hermine<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>CNRS UMR 8147, Université Paris 5, Faculté de Médecine Necker, Paris, France; <sup>2</sup>INSERM U699, Paris, France; <sup>3</sup>Université Paris 7, Faculté de Médecine Denis Diderot, Paris, France; <sup>4</sup>Service d'Hématologie, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Paris, France and <sup>5</sup>Department of Internal Medicine, American University of Beirut, Beirut, Lebanon

**HTLV-I is an endemic retrovirus responsible for the adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). This aggressive lymphoid proliferation is associated with a bad prognosis due to the resistance of HTLV-I-infected cells to most classical chemotherapeutic agents. Here we review recent advances in ATLL immunotherapy. We particularly focus on promising data from our group, characterizing a new mouse monoclonal antibody (mAb A24) against the human transferrin receptor (TfR-1). Monoclonal antibodies to target cell differentiation markers on ATLL cells have already been proposed as therapeutic agents. However, in clinical trials acute forms of ATLL were resistant to these immunotherapies. A24 binds TfR-1 ( $K_d$  2.7 nM) and competes with transferrin for receptor binding. It blocks the proliferation of malignant cells (TfR-1<sup>high</sup>), such as HTLV-I-infected T cells but not of resting cells. A24 induces TfR-1 endocytosis in lysosomal compartments where the receptor is degraded leading to intracellular iron deprivation. In HTLV-I-infected cells, A24 targets and induces apoptosis of both chronic and acute ATLL forms, independent of antibody aggregation, antibody-dependent cellular cytotoxicity and/or complement addition. The antibody efficacy was confirmed in animal models. We are currently developing strategies to use A24 in clinical trials.**  
*Leukemia* (2008) 22, 42–48; doi:10.1038/sj.leu.2404958;  
 published online 27 September 2007  
**Keywords:** adult T-cell leukemia; lymphoma; immunotherapy; transferrin receptor

#### Introduction

Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) was an aggressive lymphoid proliferation associated with the human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I).<sup>1</sup> ATLL is the first human disease to be linked with a retroviral infection. The clinical spectrum of HTLV-I infections include tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM), uveitis and infective dermatitis in children.<sup>2</sup> HTLV-I is endemic in many regions of the world (for example, Southern Japan, the Caribbean, sub-Saharan west Africa and northern Iran) affecting an estimated 20–30 million individuals, but only a subpopulation of carriers (6% male and 2% female subjects) develops ATLL after a long latent period.<sup>3</sup> HTLV-I is transmitted intravenously, by sexual contact, or through breast-feeding from

mother to child, and epidemiological evidence predicts that ATLL development occurs following childhood infection.<sup>4</sup>

ATLL exhibits diverse clinical features: the acute, the sub-acute or smoldering, the chronic forms and the ATL lymphoma.<sup>5</sup> In the two most aggressive forms (acute leukemia and lymphoma), the tumor syndrome comprises massive lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, lytic bone lesions and multiple visceral lesions with skin and lung infiltration.<sup>6</sup> The difference between these two aggressive forms is mainly based on the peripheral blood picture: acute ATL is characterized by a massive infiltration of the peripheral blood by malignant CD4<sup>+</sup> T cells (flower cells with convoluted nuclei and basophilic cytoplasm) (Figure 1), while ATL lymphoma is characterized by the presence of less than 1% of leukemic cells in the blood smear. ATLL is preceded by oligoclonal expansions of activated T-cells that are infected with HTLV-I, probably following cell-to-cell transmission.<sup>7</sup> These clonal expansions probably result, at least in early stages of the disease, from expression of the viral oncogenic transactivator protein Tax, since Tax activates the viral promoter and several cellular genes.<sup>8,9</sup>

ATLL diagnosis is generally made on morphological analysis (histological or cytological infiltration by flower cells) and on immunophenotype.<sup>6</sup> No specific chromosomal abnormalities have been associated with ATLL, but the cytogenetic analysis of leukemic cells usually shows multiple nonspecific abnormalities.<sup>10</sup> HTLV-I serology is always positive and Southern blot analysis shows clonal integration of the provirus within tumor cells (peripheral leukemic cells or involved organ biopsies).<sup>11</sup>

Smoldering and chronic forms exhibit a relatively good prognosis with an indefinite or 36-months median survival time, respectively. In contrast, acute leukemic and lymphomatous forms of ATL have a very bad prognosis with a median survival of only 6 and 10 months, respectively and a 4-year survival of about 5%. Indeed, HTLV-I cells are resistant to most apoptosis-inducing agents, and treatment of ATLL patients using conventional chemotherapy has limited benefit. Poor survival prognosis factors have been described such as a high LDH value, high leukemic counts (both reflecting an important tumor burden), hypercalcemia and a poor clinical performance status.<sup>6</sup>

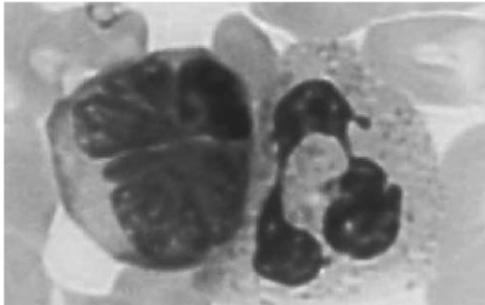
Conventional chemotherapy are efficient in promoting complete remission in a number of cases but did not improve significantly the survival rate since eventually all patients relapse. Recent studies using reduced intensity conditioning allogeneic bone marrow transplantation showed encouraging results. However, ATLL patients are often aged, have severe immunodeficiency, do not achieve complete remission or have no sibling or unrelated donors and therefore are not eligible for allogeneic transplantation. Anti-retroviral therapy increases significantly the response rate particularly in chronic and acute

Correspondence: Professor O Hermine, CNRS 8147, Faculté de Médecine Necker, Université Paris 5, 149, Rue de Sèvres 75743 Paris Cedex 15, France.

E-mail: hermine@necker.fr

<sup>6</sup>C Callens is a recipient of an INSERM fellowship (poste d'accueil, interne en biologie).

Received 13 May 2007; revised 31 July 2007; accepted 20 August 2007; published online 27 September 2007



**Figure 1** May Grünwald Giemsa staining of a flower cell near a polymorphonuclear neutrophil found in the peripheral blood of an ATLL patient.

forms of ATLL. These patients may experience long survival, particularly those presenting the wild type form of p53 within tumor cells. New alternative targeted therapy against NF- $\kappa$ B pathway (constitutively activated in ATLL cells) such as arsenic and proteasome inhibitors showed their efficacy *in vitro* alone or in combination with interferon- $\alpha$  and chemotherapy, respectively. They are currently tested in clinical trials. All these aspects have been extensively reviewed recently.<sup>12</sup> In this paper we will discuss recent advances in ATLL immunotherapy particularly presenting encouraging results that we have obtained using a novel anti-transferrin receptor antibody.

#### Advances in ATLL immunotherapy

Monoclonal antibodies (mAbs) are a very attractive approach against ATLL cells. Several authors have proposed to target cell differentiation markers on ATLL cells. The most important advantage of this strategy is the decreased adverse effects in comparison with chemotherapy. The first molecule used as a target for ATLL immunotherapy was the IL-2 $\alpha$  receptor (CD25, also called the Tac antigen). However, in clinical trials anti-CD25 antibody was not effective against acute forms of ATLL.<sup>13</sup> Furthermore, radio-immunotherapy using yttrium labeling of the anti-CD25 resulted only in a small improvement of response rates.<sup>14</sup>

The newly identified autocrine loop between IL-15 and its receptor, in addition to the established loop between IL-2 and its receptor, might contribute to the proliferation of HTLV-I infected cells.<sup>15</sup> mAbs against CD2 have shown efficient activities in ATLL mice,<sup>16</sup> and antibodies to IL-15 or to its receptor inhibited the proliferation of peripheral blood mononuclear cells from patients with HTLV-I-associated myelopathy,<sup>15</sup> but their clinical efficacy in ATLL is still unknown.

Another tested immunotherapy is the humanized anti-CD52 mAb, alemtuzumab, currently used against chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. Results using this antibody were promising in an ATLL mouse model.<sup>17</sup> However, it mainly acts by antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), which could explain the disappointing results in immunocompromised patients (O Hermine, unpublished observation). In addition, ATLL patients treated with alemtuzumab reactivate CMV replication in virtually all cases (O Hermine, unpublished observation). A recent report shows that alemtuzumab induces cell apoptosis by a p53-independent mechanism in human clinical trial.<sup>18</sup> Therefore, this mAb could be used as

an adjuvant therapy, in addition to AZT, to prevent selection of p53 mutated clones.

We have recently reported that malignant ATLL cells highly express surface transferrin receptor (TfR-1 or CD71) and that its expression positively correlates with the disease aggressiveness.<sup>19</sup> TfR-1 has already been described in other malignancies and several experiments have validated the efficacy of TfR-1 targeting to block cancer cell proliferation. We have characterized a novel anti-TfR-1 mAb (named A24) that targets and induces apoptosis of malignant cells. Thus, A24 could act both by its intrinsic capacity and by ADCC. This antibody could represent an alternative immunotherapy particularly for immunocompromised patients in which ADCC may be impaired.

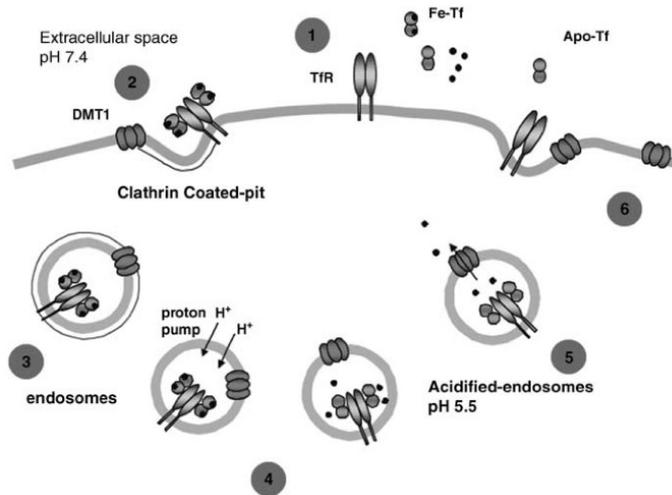
#### The transferrin receptor in normal and malignant cells

Iron is involved in essential cellular functions such as energy transport and DNA synthesis.<sup>20</sup> Transferrin is the main protein involved in serum iron transport and iron uptake is essentially dependent on receptor-mediated endocytosis, involving the transferrin receptor.<sup>21</sup>

TfR-1 is a type II transmembrane glycoprotein largely expressed on proliferating cells.<sup>22</sup> This homodimeric receptor (180 kDa) allows internalization of iron-bound transferrin in clathrin-coated pits.<sup>23,24</sup> In endosomal vesicles, iron is then released by compartment acidification (pH 5–5.5), while apo-transferrin and TfR-1 are recycled into the blood or to the cell surface, respectively (Figure 2). TfR-1 expression is strictly regulated by intracellular iron level: TfR-1 mRNA is stabilized and abundant in iron-deficient cells to increase extracellular iron uptake. This post-transcriptional regulation is allowed by the presence of iron responsive elements (IRE) in the 3'-untranslated region of the TfR-1 transcript that are recognized by two iron regulatory proteins (IRP).<sup>25</sup>

TfR-1 expression is ubiquitous but expression levels can be strongly different. Indeed, the majority of cells express this receptor at low level whereas highly proliferating cells, like cells of intestinal epithelium, erythroid precursors and malignant cells, express it at a greater level.<sup>26</sup> TfR-1 is particularly abundant on tumor cells but, most of the time, is not found on their normal counterparts, and is correlated with cancer progression and prognosis.<sup>27,28</sup> During hematopoiesis, TfR-1 is not detected on pluripotent stem cells but has been observed on erythroid progenitors and is again undetectable on mature erythroid cells.<sup>29,30</sup> In leukemia, lymphoma and myeloma, TfR-1 is expressed at higher level on circulating cancer cells.<sup>31</sup>

Recently, a new TfR, TfR-2, was cloned.<sup>32,33</sup> The extracellular domain of TfR-2 shares some homology with TfR-1 but there is no similarity between their intracytoplasmic regions. TfR-2 mRNA does not contain IRE sequences and the expression of this receptor does not appear to be regulated by intracellular iron level.<sup>32,34</sup> Nevertheless, TfR2 protein levels seem to be correlated positively with Tf saturation.<sup>35</sup> By contrast with TfR-1, TfR-2 expression is very restricted and was first described on hepatocytes and enterocytes of the small intestine only.<sup>36</sup> TfR-2 mRNA was detected in erythroid precursors, but expression of the protein in these cells remains controversial and TfR-2 gene inactivation does not affect erythroid cells production.<sup>37</sup> Interestingly, this receptor has been described on several cell lines, derived from solid tumors or myeloid hemopathies even if it is less frequent than TfR-1 on malignant cells.<sup>38</sup> Thus, as TfR-1 is particularly expressed on malignant cells, several groups have tried to target this receptor with mAbs in order to induce apoptosis or to reduce proliferation of cancer cells.



**Figure 2** Endocytosis of TfR-1 induced by Fe-Tf. At physiological pH, membrane TfR-1 binds to Fe-loaded (holo)-transferrin (1). Endocytosis starts through clathrin-coated pits (2) that invaginate and give rise to vesicles containing ligand-receptor complexes (3). Following endosomal acidification (pH 5–5.5) iron is released from transferrin (4) and pumped to cytosol through the DMT1 transporter (5). TfR-1-apo-transferrin complexes are recycled to the cell membrane and dissociate at physiological pH (6).

**Tumors and anti-TfR-1 antibodies**

Targeting the TfR-1 with mAbs has been considered an attractive therapeutic alternative against cancer cells since 1980s. However, it still remains a field of intense investigations. In this section we will summarize different antibodies that have been used to target cancer cells trying to compare their efficiency and disadvantages.

In the initial studies targeting TfR in cancer cells, rat anti-mouse TfR-1 antibodies were used to block malignant cell proliferation. The advantage of this system is its ease of use in murine cell lines and in well-established *in vivo* murine tumor models. Several cell lines were tested, predominantly of hematopoietic origin, and anti-TfR-1 antibodies impaired proliferation of these cells by blocking iron uptake.<sup>39,40</sup> All antibodies did not induce the same effect and their cytotoxic efficiency differed probably due to their different isotypes. Antibody activity was apparently dependent on the cross-linking of the cell surface receptors. In this regard, IgM proved particularly efficient to stop cellular proliferation as compared to IgG.<sup>41</sup> Animal model studies confirmed the ability of anti-TfR-1 antibodies to prevent the development of leukemia and lymphoma and allowed the demonstration of synergistic effects with iron chelators, such as deferoxamine.<sup>42</sup> However, anti-TfR-1 antibodies failed to block the proliferation of the same pre-established tumors.

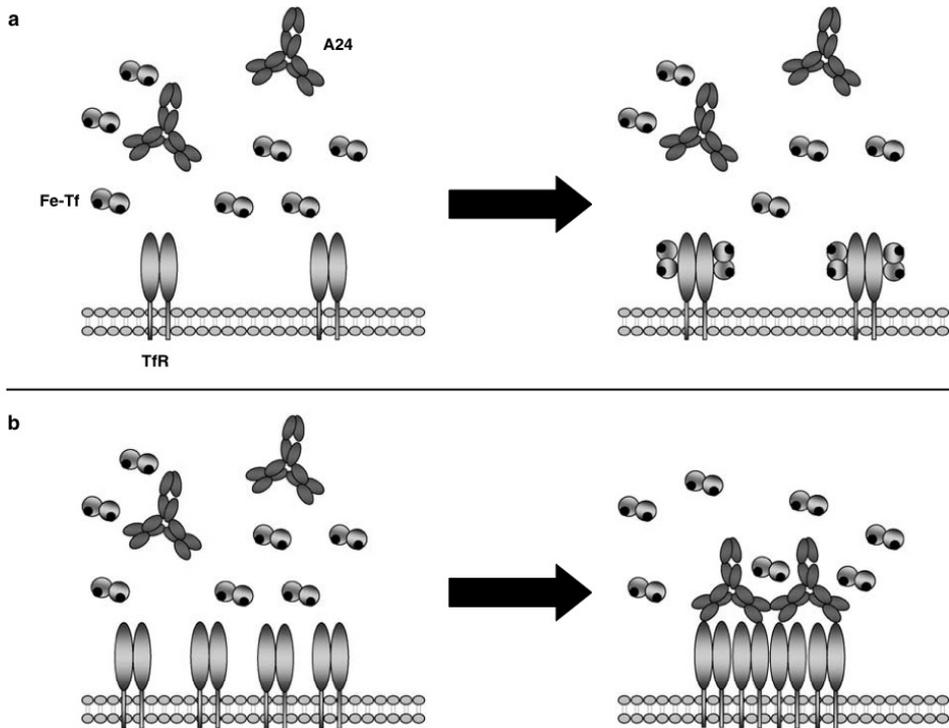
The majority of studies were realized with murine anti-human TfR-1 antibodies, particularly in normal and pathologic hematopoietic cells.<sup>43</sup> These studies confirmed the major role of receptor dimerization in the induction of apoptosis and demonstrated the higher sensitivity of leukemic progenitors compared to their normal counterparts.<sup>44,45</sup> Work with hematopoietic cell lines demonstrated some heterogeneous sensitivity to TfR antibodies that is not well elucidated.

One murine antibody demonstrated a notable cytotoxicity against human malignancies: the murine monoclonal anti-human TfR-1 antibody 42/6. This mAb (curiously an IgA isotype)

deprives cells of iron by a noncompetitive blocking of transferrin binding to its receptor.<sup>46</sup> 42/6 was tested on normal T cells, lymphoid and myeloid leukemia cell lines. It blocks cell proliferation in a manner reversible 48 h after its removal from the culture medium.<sup>43</sup> CFU-GM isolated from chronic myelogenous leukemia patients appeared more sensitive to the cytotoxic effects of 42/6 than CFU-GM isolated from healthy volunteers. First *in vitro* promising results encouraged a clinical trial in 27 patients with diverse refractory cancers. Even if there were minimal side effects, intravenous infusions of 42/6 demonstrated partial anti-tumoral effects only in three patients because of the rapid clearance of IgA in circulation and human anti-mouse IgA immune response.<sup>47</sup> Indeed, murine monoclonal anti-TfR-1 antibodies were found to have significant limitations such as short half-life, immunogenicity and lower effector functions because their constant regions are not recognized by the human effector system for ADCC and complement-dependent cytotoxicity (CDC). This underlined the need to develop some chimeric or humanized anti-TfR-1 antibodies.<sup>48</sup> Several approaches were started to develop chimeric antibodies from murine anti-TfR-1 antibodies using chicken avidin that can interact with numerous biotinylated therapeutic agents, especially against hematopoietic malignancies.<sup>49</sup> An anti-human transferrin receptor IgG3-avidin fusion protein was reported to inhibit the proliferation of malignant cells dependent of antibody cross-linking.<sup>50</sup> This anti-hTfR IgG3-Av was also shown to induce TfR internalization into lysosomal LAMP-1 positive compartments and induction of apoptosis through caspases 3, 8 and 9 activation.<sup>51</sup>

**A24, a new anti-TfR-1 antibody and perspectives in ATLL treatment**

Our group has previously reported the characterization of a new mouse mAb against the human TfR-1 (A24, an IgG2b kappa)<sup>52</sup>

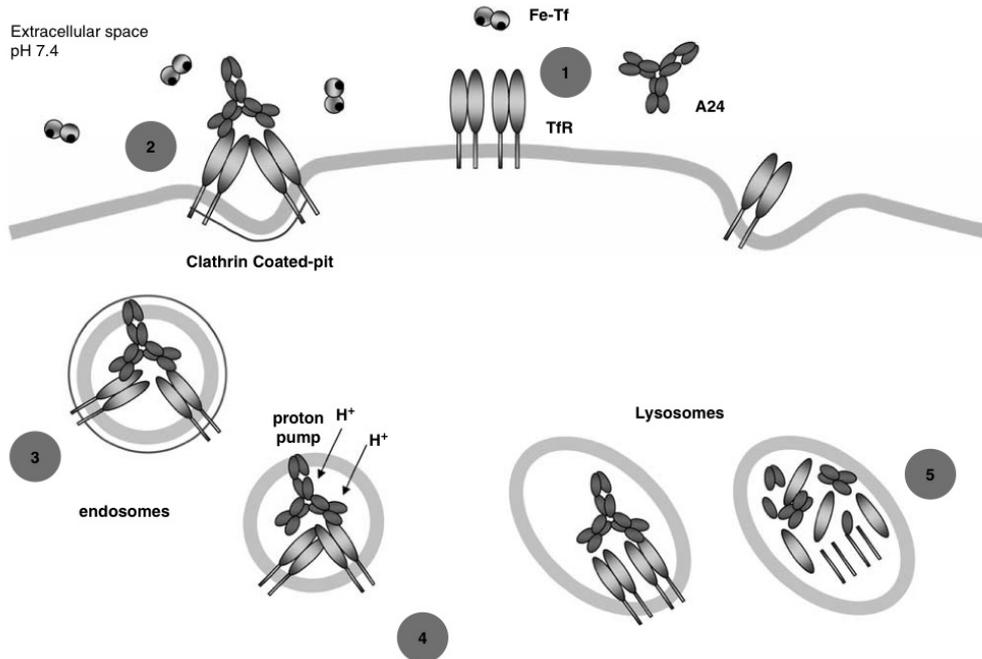


**Figure 3** A24 competes with Fe-Tf for receptor binding. Surface plasmon resonance experiments were performed to determine the binding properties of A24 and Fe-Tf to the TIR-1 ectodomain. The affinity of A24 for a low-density surface of TIR-1 was three times lower than that of Fe-Tf. Thus, in cells expressing low density of TIR-1 Fe-Tf binding to its receptor is favored (a). However, unlike the monovalent ligand Fe-Tf, A24 possesses two binding sites, and therefore the avidity of this bivalent IgG is dependent on the available density of the receptor on the cell surface. We showed that the dissociation rate ( $k_{off}$ ) of the A24/TIR-1 complex was six times lower when TIR-1 was available at higher densities. In these conditions, like in high proliferative cells (TIR-1 high positive) A24 binding to TIR-1 is favored (b).

that blocks the proliferation of malignant cells.<sup>19</sup> Using surface plasmon resonance analysis, we showed that A24 associates with TIR-1 and competes with Fe-Tf for receptor binding. We also determined that A24 has a lower affinity to TIR-1 than Fe-Tf (2.69 versus 0.98 nM, respectively). However, under high receptor density A24 binding to TIR-1 was higher than that of Fe-Tf due to avidity interactions of bivalent antibody. Thus, A24 can specifically target high proliferating (TIR-1 high) cells (Figure 3). Our first experiments, made with normal activated T cells since TIR-1 expression is required for T-cell growth, demonstrated that A24 inhibits the proliferation of activated T cells. In addition, A24 inhibited <sup>55</sup>Fe-Tf uptake inducing cell apoptosis. TIR-1 expression is tightly regulated and essential for malignant T-cell proliferation. Furthermore, since *in vitro* infection of T cells with HTLV-I induced upregulation of TIR-1 on the cell surface, we decided to evaluate the potential effect of A24 against ATL cells. We observed that HTLV-I-infected T cells from acute forms of ATL expressed TIR-1 at levels higher than those observed in chronic ATL forms. *In vitro*, A24 blocked both acute and chronic forms of ATL in contrast to IL-2-R $\alpha$ -mAb (daclizumab) and inhibited the emergence of HTLV-I-infected T-cell clones. The association of IFN- $\alpha$ , AZT or etoposide with A24 improved the inhibition of tumor cells

proliferation. Observations in normal activated T-cells were confirmed in HTLV-I infected T-cells in which A24 abrogates the TIR-1 recycling inducing iron deprivation and apoptosis. Altogether, these results demonstrated that efficient therapeutic tools to treat acute forms of ATL might be derived from A24.<sup>19</sup>

We have recently extended experiments to other lymphomas, particularly in Mantle cell lymphoma (MCL) that is one of the most frequent non-Hodgkin's lymphomas. TIR-1 was highly expressed on both MCL biopsies and freshly isolated tumor cells from MCL leukemic patients, whereas TIR-1 expression was low in resting B cells. A24 blocked cell proliferation without the need for antibody aggregation or cell-mediated cytotoxicity. A24 reduced and impaired TIR-1 cell surface expression and recycling by receptor sequestration in lysosomal compartments (Figure 4). In addition, one single antibody injection totally prevented xenografted MCL tumor establishment in nude mice and delayed tumor progression of established tumors, prolonging mice survival. A24 also synergized with both chemotherapeutic agents (etoposide and cytarabine) and rituximab. The effect of A24 on cell proliferation was mediated through the induction of programmed cell death determined by the caspase-3 and caspase-9 activation. Finally, A24 induced TIR-1



**Figure 4** Endocytosis of TfR-1 induced by A24. In cell membranes containing high density of TfR-1, like in tumor cells, A24 binds to TfR-1 (1). A24/TfR-1 complexes are endocytosed through the classical clathrin-coated AP-2-dependant pathway (2–3). Endosomes are acidified (4) and TfR-1/A24 complexes instead of recycling back to cell membrane finally end up in lysosomes where they are degraded (5).

endocytosis via the clathrin adaptor protein complex AP-2 pathway followed by transport to lysosomal compartments.<sup>53</sup>

Altogether, these results identify A24 as a potential new therapeutic agent, alone or in combination with other mAbs and/or chemotherapeutic agents. Furthermore, our *in vivo* data suggest that A24-based treatments could be promising to prevent relapse in ATLL.

### Concluding remarks

ATLL represents an important health problem since the population infected by HTLV-I is estimated to be of 20–30 millions individuals. However, since only a subpopulation of carriers will develop ATLL after a long latent period, approaches in HTLV-1 infection, prevention are still few, especially in developing countries. Despite recent advances in the use of conventional chemotherapy, allogeneic bone marrow transplantation and new-targeted therapies, ATLL therapeutic approaches are still a major challenge for clinicians because patients outcome have been disappointing. Alternatively, immunotherapeutic approaches were also suggested in ATLL but acute forms are resistant to antibodies against the  $\alpha$  chain of the IL-2 receptor and the anti-CD52 antibody, alemtuzumab, exacerbates immunosuppression.

Efficient therapeutic tools could also be derived from the targeting of the TfR. We have recently reported a new anti-TfR-1 antibody (A24) that targets and induces apoptosis in both chronic and acute ATL forms. In addition, A24 has a synergistic

effect with chemotherapy suggesting that it could be used alone or in combination with these drugs to eradicate ATLL cells. Importantly, A24 acts on its own independent of antibody aggregation, ADCC and/or complement addition. Our results, *in vivo* and *in vitro*, demonstrate that efficient ATLL therapies might be derived from this antibody. Therefore, A24 seems to be a new attractive therapy to be used in ATLL. We are at the present developing strategies to use it in clinical trials.

### Acknowledgements

This study is supported by ARC grant ML/MLD/CM-A03/1, Arreca, Cancerpole Ile de France, FRM, INCA, Association Laurette Fugain, La Ligue Contre le Cancer and Fondation de France.

### References

- Hinuma Y, Komoda H, Chosa T, Kondo T, Kohakura M, Takenaka T *et al*. Antibodies to adult T-cell leukemia-virus-associated antigen (ATLA) in sera from patients with ATL and controls in Japan: a nation-wide sero-epidemiologic study. *Int J Cancer* 1982; **29**: 631–635.
- Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A *et al*. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-1 in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 1985; **2**: 407–410.
- Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-1 infection and associated diseases. *Oncogene* 2005; **24**: 6058–6068.
- Ando Y, Ekuni Y, Matsumoto Y, Nakano S, Saito K, Kakimoto K *et al*. Long-term serological outcome of infants who received

- 50 Ng PP, Dela Cruz JS, Sorour DN, Stinebaugh JM, Shin SU, Shin DS *et al*. An anti-transferrin receptor-avidin fusion protein exhibits both strong proapoptotic activity and the ability to deliver various molecules into cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 10706–10711.
- 51 Ng PP, Helguera G, Daniels TR, Lomas SZ, Rodriguez JA, Schiller G *et al*. Molecular events contributing to cell death in malignant human hematopoietic cells elicited by an IgG3-avidin fusion protein targeting the transferrin receptor. *Blood* 2006; **108**: 2745–2754.
- 52 Moura IC, Centelles MN, Arcos-Fajardo M, Malheiros DM, Collawn JF, Cooper MD *et al*. Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. *J Exp Med* 2001; **194**: 417–425.
- 53 Lepelletier Y, Camara-Clayette V, Jin H, Hermant A, Coulon S, Dussiot M *et al*. Prevention of mantle lymphoma tumor establishment by routing transferrin receptor toward lysosomal compartments. *Cancer Res* 2007; **67**: 1145–1154.

## **L'érythropoïèse tardive : une mort avortée ?**

Geneviève Courtois, Julie Vandekerckhove, Mickael Dussiot, Joëlle Kersual, Séverine Coulon, Zakia Belaid, Yael Zermati, Jean-Antoine Ribeil, Olivier Hermine

**Hématologie** 2007 ; 13 (6) : 400-8

## L'érythropoïèse tardive : une mort avortée ?

Late erythropoiesis: an aborted death?

Geneviève Courtois<sup>1</sup>  
Julie Vandekerckhove<sup>1</sup>  
Mickael Dussiot<sup>1</sup>  
Joëlle Kersual<sup>1</sup>  
Séverine Coulon<sup>1</sup>  
Zakia Belaid<sup>2</sup>  
Yael Zermati<sup>3</sup>  
Jean-Antoine Ribeil<sup>1</sup>  
Olivier Hermine<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université Paris V, CNRS UMR 8147  
et Département d'hématologie,  
Faculté de Médecine et  
Université René Descartes Paris V,  
Hôpital Necker,  
75743 Cedex 15  
<courtois@necker.fr>

<sup>2</sup> Service d'histologie-cytologie  
(FNRS-CRCE),  
Université de Liège,  
Belgique

<sup>3</sup> Département d'hématologie,  
Institut Cochin,  
Paris

**Résumé.** La survie et la prolifération des progéniteurs et précurseurs érythroïdes se trouvent sous le contrôle de l'érythropoïétine (Epo), qui est le principal régulateur de l'érythropoïèse. La différenciation érythroïde s'effectue sous la dépendance du facteur de transcription GATA-1 qui active l'expression des gènes de différenciation et de survie. La production des globules rouges est finement régulée par l'inhibition ou au contraire par l'induction de l'apoptose des progéniteurs et des précurseurs érythroïdes. La baisse du taux d'Epo circulante ou l'induction de la voie Fas aboutissent à l'activation de la caspase-3 qui entraîne la protéolyse de GATA-1, l'arrêt de maturation et l'apoptose des érythroblastes immatures. Nous avons montré qu'une activation transitoire de la caspase-3 par la voie mitochondriale est indispensable à la maturation érythroïde. Dans ce contexte, la protéine chaperonne hsp70 joue un rôle majeur en protégeant GATA-1 du clivage par la caspase-3. La différenciation terminale est caractérisée par une réduction progressive du volume cellulaire et du noyau associée à une condensation de la chromatine. Ces changements morphologiques présentent certaines similitudes avec ceux observés dans les cellules en cours d'apoptose. L'énucléation s'effectue ensuite au sein d'îlots érythroblastiques constitués d'un macrophage central étroitement associé par des molécules d'adhérence à des érythroblastes en cours de maturation. La membrane de l'érythroblaste perd progressivement son affinité pour le macrophage alors que le noyau reste fixé, ce qui permet l'énucléation et la phagocytose du noyau par le macrophage. Les réticulocytes ainsi formés vont compléter leur maturation en perdant leurs organelles et en remodelant leur membrane. Nos études suggèrent que le devenir des précurseurs érythroïdes (apoptose versus différenciation) est déterminé par le choix des cibles clivées par les caspases. Si la fonction du clivage de certaines protéines telles que la lamine B ou acinus est bien connue, l'identité et la fonction des autres cibles clivées par les caspases au cours de la maturation terminale restent à déterminer.

**Mots clés :** érythroblaste, GATA-1, caspases, apoptose, énucléation

**Abstract.** Epo is the crucial regulator of survival and proliferation of erythroid progenitors. Erythroid differentiation process involves the transcription factor GATA-1 that activates differentiation and survival genes. The production of red cells is tightly regulated and depends on inhibition or induction of apoptosis of erythroid progenitors. Upon Epo starvation or engagement of the death receptor Fas, caspases are activated leading to GATA-1 cleavage, inducing maturation arrest and apoptosis of immature erythroblasts. We have demonstrated that upon Epo stimulation, caspase-3 was also transiently activated through the mitochondrial pathway, an event required for terminal maturation. In this context, the chaperone protein Hsp70 has a major function in protecting GATA-1 from caspase-3 mediated cleavage. Terminal erythroid differentiation is characterized by morphological changes partially similar to those observed during apoptosis. These include cell and nucleus size reduction and chromatin condensation. Erythroblasts enucleate within specialized niches termed erythroblastic islands composed of differentiating

Tirés à part :  
G. Courtois

400

Hématologie, vol. 13, n° 6, novembre-décembre 2007

© John Libbey Eurotext, 2007

doi: 10.1056/haem.2007.03.000

erythroblasts surrounding a central macrophage. Erythroblasts-macrophage interactions involve adhesion molecules. When erythroblasts undergo enucleation, the plasma membrane lose their affinity for the macrophage, whereas the nuclei remain attached to the macrophage leading to engulfment of the expelled nuclei. Newly formed reticulocytes degrade internal organelles and the membrane remodeling occurs. Our studies suggest that the fate of erythroid precursors (apoptosis versus differentiation) is determined downstream of caspase activation by the pattern of cleaved targets. Cleavage of nuclear proteins such as Lamin B or Acinus involved in nuclear and chromatin condensation has been described. Identifying new caspase targets involved in erythroid maturation remains to be determined.

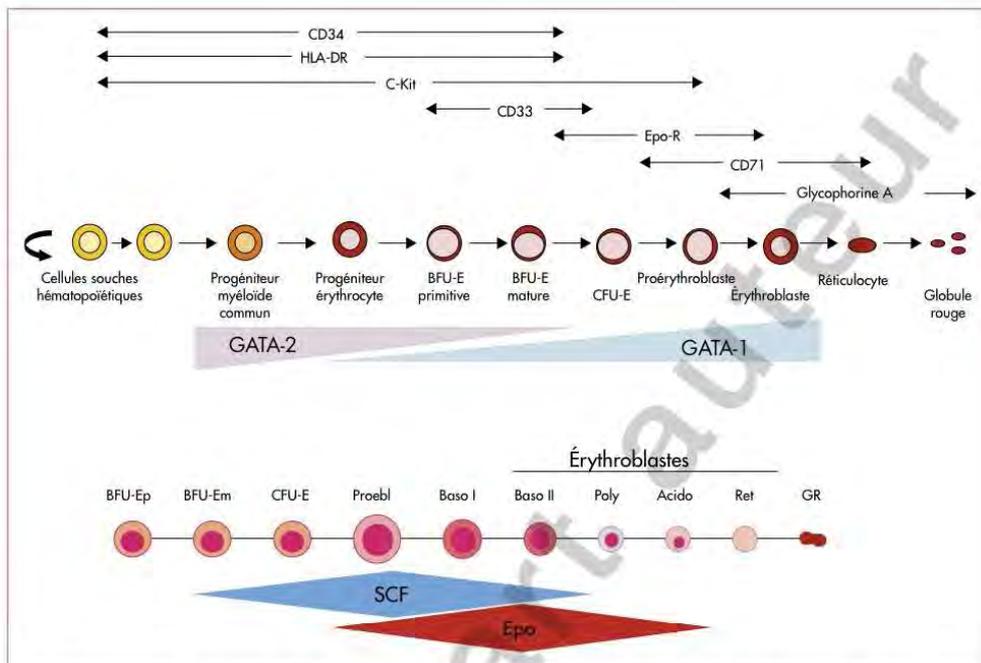
**Key words:** erythroblast, GATA-1, caspases, apoptosis, enucleation

**L'**érythropoïèse est un processus complexe qui a lieu chez l'adulte dans la moelle osseuse et aboutit à la formation de 100 milliards de globules rouges par jour. Ils sont formés à partir d'une cellule souche multipotente qui va subir des étapes de maturation successives sous le contrôle du facteur de transcription GATA-1 responsable de l'activation des gènes de différenciation érythroïdes ainsi que du gène codant pour la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>1</sub>. Leur production dépend du taux d'apoptose des progéniteurs et des précurseurs érythroïdes et elle est finement régulée pour permettre d'adapter la production de globules rouges aux besoins en oxygène des tissus périphériques. Nous avons montré que l'enzyme clé effectrice de l'apoptose, la caspase-3, est indispensable aux modifications morphologiques observées au cours de la différenciation érythroïde terminale humaine [1]. Dans ce contexte de différenciation, bien que la caspase-3 soit activée, il n'y a ni apoptose, ni clivage du facteur de transcription GATA-1 indispensable à la différenciation érythroïde terminale. Nous avons également montré que la protéine chaperonne Hsp70 joue un rôle majeur au cours de la différenciation érythroïde, en protégeant GATA-1 du clivage par la caspase-3 [2]. L'objectif de cette revue est de décrire les étapes de la maturation érythroïde terminale en discutant le rôle joué par les caspases dans ce processus.

### Érythropoïèse : généralités

Les érythrocytes de l'homme adulte normal proviennent d'une cellule souche hématopoïétique qui va s'engager dans une voie de différenciation myéloïde, vers un progéniteur multipotent. Ce progéniteur appelé CFU-GEMM (pour *Colony Forming Unit Granulocyte/Erythrocyte/Megacaryocyte/Macrophage*) va ensuite se différencier vers un progéniteur restreint dans la voie érythroïde, appelé BFU-E (*Burst Forming Unit Erythroid*). Le BFU-E va proliférer à son tour, et se différencier par étapes successives en environ 3 semaines chez l'homme pour aboutir à la formation de précurseurs érythroblastiques morphologiquement reconnaissables au

niveau médullaire (proérythroblastes et érythroblastes), et de globules rouges matures dans le sang circulant. L'engagement des progéniteurs multipotents vers la voie érythroïde semble s'effectuer grâce à une combinaison d'expression de facteurs de transcription et en particulier du facteur GATA-1 qui permet la régulation positive des promoteurs des gènes érythroïdes comme la glycophorine A, des promoteurs de globine, et du récepteur à l'érythropoïétine (Epo) [3]. En son absence, la production de globules rouges est impossible. Des expériences effectuées sur des cellules souches embryonnaires (ES) invalidées pour le gène de GATA-1 ont montré que dans les phases précoces, la protéine GATA-1 pouvait être remplacée par d'autres facteurs de transcription de la famille GATA tels que GATA-2. En revanche, GATA-1 est absolument nécessaire dans les phases tardives de l'érythropoïèse, en régulant progressivement l'expression de la protéine antiapoptotique Bcl-x<sub>1</sub>. Les différents progéniteurs érythroïdes ont été définis grâce à leurs caractéristiques de culture en milieux semi-solides. Les progéniteurs BFU-E vont donner de grosses colonies érythroïdes contenant plusieurs centaines de milliers d'érythroblastes matures, après 21 jours de culture chez l'homme. Les CFU-E, qui sont les progéniteurs les plus matures, vont donner des colonies d'environ 30 à 60 érythrocytes en moins d'une semaine. Grâce à ces techniques en milieu semi-solides, les caractéristiques immunophénotypiques et les besoins en facteurs de croissance de ces différents progéniteurs ont pu être déterminés. Les progéniteurs les plus précoces expriment l'antigène CD34, et le récepteur au *stem cell factor* (SCF), c-kit. À partir du stade BFU-E, le récepteur à l'érythropoïétine commence à être exprimé avec un maximum d'expression au niveau des CFU-E. Les antigènes spécifiques de la lignée érythroïde, comme les antigènes des groupes sanguins ou la glycophorine A, s'expriment au niveau des CFU-E. D'autres marqueurs non spécifiques comme le récepteur à la transferrine fortement exprimé à partir des BFU-E, et l'antigène CD36 (également présent sur les mégacaryocytes et les monocytes matures) permettent d'identifier ces progéniteurs (figure 1). Deux facteurs de croissance sont indispensables, le SCF pour les phases précoces jusqu'au stade CFU-E, et l'Epo à partir des BFU-E tardifs jusqu'au stade des érythroblastes [4].



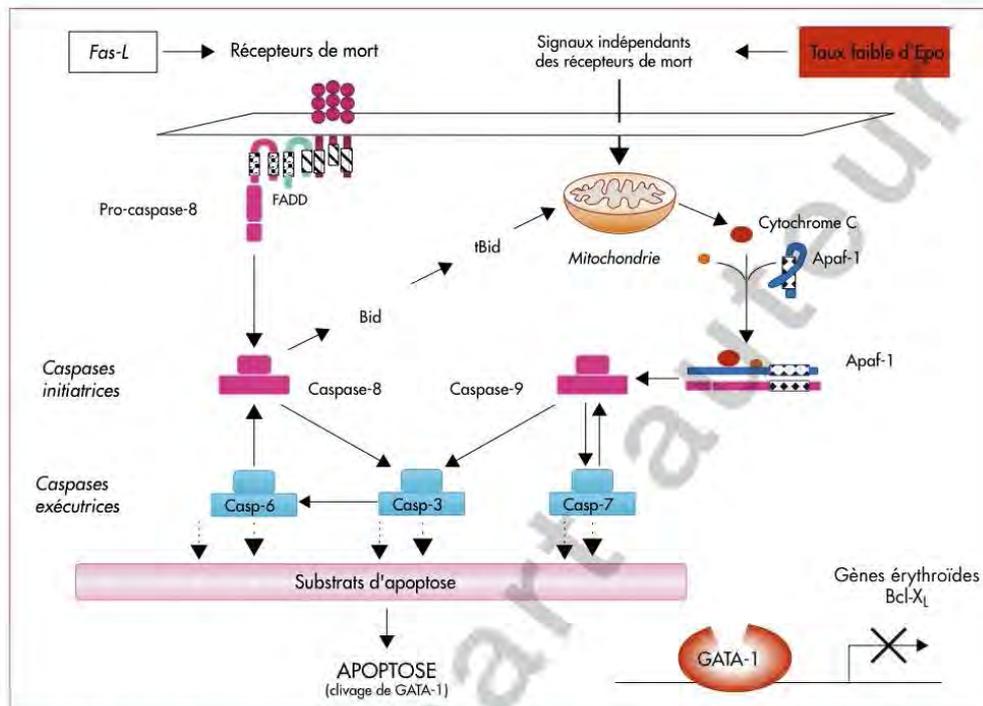
**Figure 1.** Érythropoïèse. Les différents précurseurs érythroïdes sont caractérisés par l'expression de marqueurs de surface. Ils sont dépendants de l'Epo à partir du stade BFU-E mature (BFU-Em). Les facteurs de transcription GATA-2 et GATA-1 sont exprimés de façon séquentielle. Proebl : proérythroblaste ; Baso : érythroblaste basophile ; Poly : érythroblaste polychromatophile ; Acido : érythroblaste acidophile ; Ret : réticulocyte ; GR : globule rouge.

Le SCF est fabriqué par les cellules stromales de la moelle osseuse. Il existe sous une forme soluble et une forme transmembranaire qui semble prédominer pour la régulation de l'érythropoïèse puisque les souris n'exprimant que la forme soluble sont anémiques. Le SCF agit sur son récepteur c-kit, qui est un récepteur à activité tyrosine kinase, et va induire des signaux de survie et de prolifération pour les progéniteurs érythroïdes. En ralentissant la différenciation, il permet une expansion des progéniteurs les plus immatures ayant les potentiels prolifératifs les plus importants. Il agit en synergie avec d'autres facteurs pour la prolifération, notamment avec le GM-CSF et l'interleukine (IL) 3 [5]. Il pourrait également augmenter la sensibilité des CFU-E à l'Epo. L'Epo est le facteur régulateur principal de l'érythropoïèse. Celle-ci est produite par le rein et va agir au niveau de la moelle osseuse pour stimuler la production des globules rouges. Cette production va apporter de l'oxygène dans les cellules rénales qui vont alors diminuer leur synthèse d'Epo, ce qui en retour aura pour conséquence une diminution de la production de globules rouges. Il existe donc à ce niveau une véritable régulation endocrine, le rein étant la « glande »

productrice et la moelle osseuse l'organe cible. Ainsi, physiologiquement, on a pu retrouver une parfaite corrélation entre le taux d'hémoglobine et le taux d'Epo. Cette production est altérée de façon significative au cours de nombreuses pathologies à l'origine d'une anémie. En se fixant sur son récepteur, l'Epo recrute des protéines ayant une activité tyrosine kinase telles que JAK2 qui en retour vont phosphoryler le récepteur et ses substrats. Le récepteur activé recrute également les protéines de la famille STAT qui vont être phosphorylées par JAK2, s'hétérodimériser, puis migrer dans le noyau pour augmenter l'expression de certains gènes. STAT5 agit ainsi en synergie avec GATA-1 pour augmenter l'expression de Bcl-x<sub>L</sub>. Il semble bien établi que les voies activées par l'Epo permettent la prolifération et la survie par l'intermédiaire de la PI-3kinase et la voie des MAP kinases [6, 7].

### Régulation de l'érythropoïèse

Le modèle proposé actuellement est un modèle où les progéniteurs érythroïdes tardifs, essentiellement les CFU-E, auraient



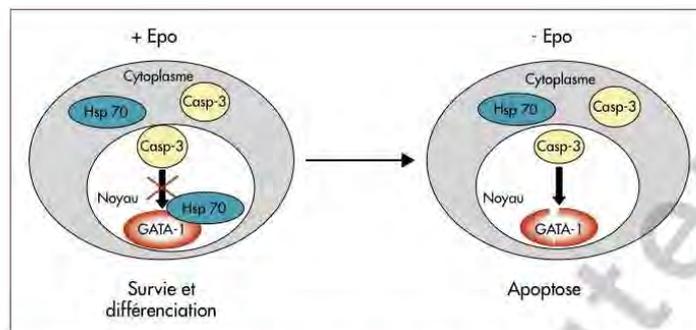
**Figure 2.** Régulation de l'apoptose au cours de l'érythropoïèse. Les progéniteurs érythroïdes matures qui expriment le Fas-L induisent l'apoptose des progéniteurs immatures qui expriment Fas. De plus, en présence de faibles concentrations d'Epo, l'érythropoïèse est régulée négativement par l'apoptose des progéniteurs érythroïdes moins sensibles à l'Epo.

les taux d'activation des caspases ne semblent pas significativement différents entre apoptose et différenciation et ne peuvent donc pas expliquer le clivage préférentiel de certaines cibles. Dans certains modèles comme celui de la différenciation des mégacaryocytes, l'activation des caspases pourrait avoir lieu dans des compartiments subcellulaires spécifiques. Les mécanismes qui sous-tendent à ces différences de localisation ne sont pas connus actuellement. Dans d'autres modèles comme celui de la spermatogenèse des drosophiles, des inhibiteurs des caspases comme les IAP pourraient se localiser dans différents compartiments pour bloquer de façon élective l'activation des caspases et protéger certaines cibles.

Au cours de l'érythropoïèse, Bcl-x<sub>L</sub> est la principale protéine antiapoptotique dont la fonction est d'inhiber l'ouverture des pores mitochondriaux et ainsi la libération vers le cytosol de molécules pro-apoptotiques (cytochrome c, Smac/DIABLO). Son rôle se situe en amont de l'activation des caspases, et ne peut pas expliquer la différence de protection spécifique de certains substrats, entre les érythroblastes cultivés en Epo et ceux dont l'apoptose est induite par privation d'Epo. Il existe

donc d'autres mécanismes faisant intervenir des molécules antiapoptotiques qui pourraient, en fonction de leur localisation, agir sur une cible pour empêcher son clivage par les caspases. Les protéines de choc thermique (*Heat shock proteins* [Hsp]) pourraient remplir cette fonction au cours de l'érythropoïèse.

Les Hsps, définies à l'origine pour leur rôle protecteur contre le choc thermique, constituent une classe de protéines très conservées dans l'évolution. Parmi ces protéines, la famille Hsp70 est constituée de plusieurs membres dont la protéine Hsp70 inducible par le stress. Dans les conditions normales, les Hsp70 sont des molécules chaperonnes ATP-dépendantes impliquées dans la conformation des polypeptides nouvellement synthétisés, l'assemblage des complexes multiprotéiques et le transport transmembranaire. L'expression d'Hsp70 inducible a été observée en présence de divers stress, en réponse à des stimuli apoptotiques, à la génération de radicaux libres, la modification du potentiel transmembranaire mitochondrial et l'activation des caspases. Hsp70 protège les cellules de l'apoptose en agissant à la fois en amont de l'activation des caspases en s'associant à Bax ou à



**Figure 3.** Le rôle d'Hsp70 au cours de la différenciation érythroïde terminale. L'Epo permet le maintien nucléaire d'Hsp70 qui protège GATA-1 du clivage par la caspase-3. En absence d'Epo, Hsp70 est délocalisé vers le cytoplasme et la caspase-3 clive GATA-1, ce qui entraîne l'arrêt de différenciation et l'apoptose des progéniteurs érythroblastiques.

AIF (Apoptosis Inducing Factor)) et en aval de la mitochondrie en s'associant au cytochrome c et à Apaf-1. L'effet antiapoptotique d'Hsp70 peut également s'exercer par blocage de la fragmentation de l'ADN. Le point de non-retour dans la voie de l'apoptose se situe donc en aval de l'activation des caspases.

Au cours de l'érythropoïèse, pendant la phase d'activation des caspases, le facteur de transcription GATA-1 colocalise dans le noyau des érythroblastes avec la caspase-3. Nous avons montré qu'à ce stade de la différenciation, la protéine Hsp70 est localisée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau où son association avec GATA-1 le protège du clivage par la caspase-3. Au cours de l'apoptose induite par privation d'Epo, Hsp70 est délocalisé vers le cytoplasme, permettant le clivage de GATA-1 par la caspase-3 [2]. Nous proposons donc un modèle dans lequel l'Epo détermine le destin des érythroblastes (différenciation versus apoptose) en aval de la caspase-3 en régulant la localisation subcellulaire d'Hsp70 (figure 3).

## Étapes de la maturation terminale

### Les îlots érythroblastiques

L'érythropoïèse nécessite l'établissement d'unités anatomiques distinctes appelées îlots érythroblastiques localisés dans le foie fœtal, la moelle osseuse et également dans la rate chez la souris. Ces structures sont constituées d'érythroblastes à différents stades de maturation entourant un macrophage central [12] (figure 4). Le rôle essentiel du macrophage dans l'érythropoïèse définitive est illustré par des travaux décrivant le phénotype d'embryons invalidés pour le gène Rb qui développent une anémie létale. Celle-ci résulte d'anomalies des macrophages qui ont perdu leur capacité d'interaction avec les érythroblastes. Ce phénotype est dépendant du facteur Id2 dérégulé par l'absence de Rb, qui inhibe alors

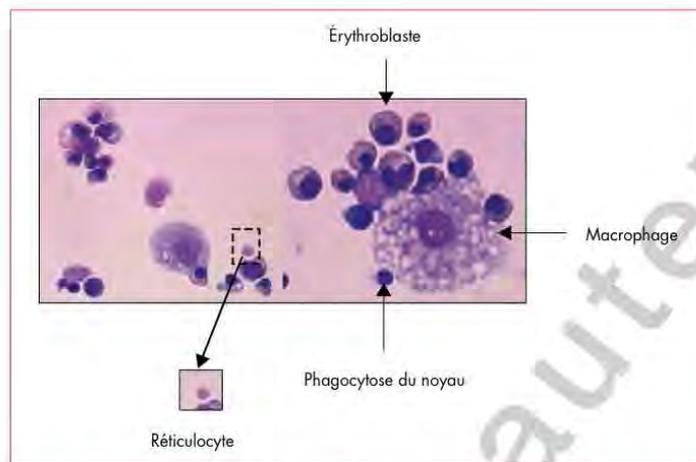
l'activité transcriptionnelle de PU-1 et la maturation des macrophages [13].

Un contact membranaire étroit s'établit entre les macrophages et les cellules érythroblastiques par l'intermédiaire d'extensions cytoplasmiques dérivées du macrophage. Bien que les érythroblastes expriment de nombreuses molécules d'adhérence, seules quelques-unes participent à ces interactions. Une protéine transmembranaire de 36 kDa, Fmp, découverte à la surface des érythroblastes et des macrophages module la liaison entre ces cellules [14].

D'autres interactions entre les érythroblastes et le macrophage font intervenir VLA4-VCAM1 d'une part [16], et ICAM-4-intégrine  $\alpha_v$  d'autre part, qui participent également à la formation de l'îlot et jouent un rôle critique dans le maintien de son intégrité [15]. D'autres récepteurs du macrophage comme EbR et SER ont été décrits, mais leur rôle n'a pas été établi de façon précise. L'intégrité de la structure des îlots implique également des interactions entre les érythroblastes et la matrice extracellulaire par l'intermédiaire d'intégrines [16].

### Réorganisation du noyau

Au cours de la maturation de l'érythroblaste, on observe une réduction de la taille du noyau, une disparition des nucléoles et une condensation de la chromatine concomitantes avec l'arrêt du cycle cellulaire et de la réplication de l'ADN. Ces changements morphologiques sont à rapprocher de ceux que l'on observe au cours de l'apoptose. Nos études et celles d'autres groupes suggèrent que le destin des précurseurs érythroïdes (apoptose versus différenciation) est déterminé par le choix des cibles clivées par les caspases. En effet, l'activation en cascade de la caspase-3 puis de la caspase-6 active la lamine B, protéine associée à la membrane nucléaire dont le clivage est nécessaire à la condensation du noyau. La protéine acinus, impliquée dans la condensation de la chromatine est également clivée par la caspase-3.



**Figure 4.** Maturation terminale des érythrocytes. La différenciation terminale se fait au sein de l'îlot érythroblastique composé d'un macrophage entouré d'érythroblastes à différents stades de maturation. Le macrophage permet l'énucléation de l'érythrocyte. Le noyau expulsé est ensuite phagocyté par le macrophage ce qui permet la production de réticulocytes matures.

Inversement, ICAD n'est pas clivé, reste associé à CAD, et inhibe son activité de fragmentation de l'ADN. La distribution des protéines appartenant à différents sous-compartiments nucléaires a été étudiée dans des érythroblastes isolés de souris infectées par la souche anémiant du virus de Friend (FVA) [17].

Ces travaux ont montré que pendant la phase tardive de l'érythropoïèse, la réorganisation du noyau s'effectue de façon sélective et que des protéines majeures de la matrice nucléaire comme NuMA et des facteurs d'épissage tels que les snRNPs persistent. Cependant, plusieurs protéines du pore nucléaire (Nup153, Tpr, Nup62, Nup358) demeurent intactes mais sont redistribuées en fin de différenciation. Cette réorganisation permet le maintien de la transcription d'un certain nombre d'ARN comme ceux des globines  $\alpha$  et  $\beta$  ou de Bcl-x<sub>L</sub> et leur export nécessaires à la poursuite du processus de différenciation. En plus du rôle des caspases, une étude suggère une fonction possible de p53 pendant les dernières étapes de la différenciation. En effet, une expression importante de p53 est observée dans les érythroblastes acidophiles ; cette activation pourrait être associée à la dégradation nucléaire qui s'effectue à ce stade, sans l'exécution complète du processus apoptotique, en raison de la décroissance de l'activité des caspases. La maturation terminale nécessite également l'activité de la survivine dont la délétion hétérozygote affecte le processus d'énucléation [18].

### L'énucléation

À la fin de la maturation de l'érythroblaste, on observe une migration du noyau à la périphérie de la cellule et un bourgeonnement de la membrane. L'observation au micro-

scope électronique montre que le noyau est entouré par une membrane plasmique intacte et relié au réticulocyte par une fine extension membranaire. À cette étape, la composition de la membrane plasmique change et s'enrichit en concanaviline A dans sa région périnucléaire. Les protéines de membrane sont alors redistribuées sur le réticulocyte en laissant le noyau dépourvu d'éléments squelettiques [19]. Une étude de la glycophorine A à ce stade suggère que la force de sa liaison au squelette par l'intermédiaire de protéines comme l'ankyrine ou la bande 3 détermine sa redistribution sur le réticulocyte [20].

Celui-ci perd progressivement son affinité pour le macrophage alors que le noyau reste fixé. Une exposition à une faible force physique est alors capable de rompre cette connexion et de libérer le réticulocyte dans le flux sanguin. Après son expulsion, le noyau expose rapidement à sa surface des phosphatidyl sérines qui constituent un signal à la phagocytose par les macrophages. Il semble qu'à ce stade, le noyau contienne un taux d'ATP très faible et une concentration en Ca<sup>2+</sup> élevée. Ces perturbations pourraient inactiver l'aminophospholipide transférase et activer la scramblase entraînant une relocalisation des phosphatidyl sérines [21]. L'invalidation du gène Emp a montré que cette protéine est indispensable à l'énucléation [22]. En effet, les embryons Emp<sup>-/-</sup> meurent au 19<sup>e</sup> jour du développement avec des altérations importantes des lignages érythroïde et macrophagique. On retrouve dans leur sang périphérique un nombre important d'érythrocytes immatures nucléés alors qu'aucun îlot érythroblastique n'est observé dans le foie fœtal. Ces érythroblastes peuvent toutefois se fixer aux macrophages de type sauvage, mais restent incapables d'énucléer. La pro-

téine Emp est associée à l'actine F, dont la polymérisation est indispensable à l'énucléation. Son absence pourrait expliquer les altérations de la distribution de l'actine dans les érythroblastes mutants et le défaut d'énucléation.

La déoxyribonucléase II (Dnase II) présente dans les lysosomes du macrophage est responsable de la dégradation de l'ADN après expulsion de l'érythroblaste [23], comme c'est le cas lors de la phagocytose des cellules apoptotiques. L'invalidation de son gène entraîne une anémie sévère chez la souris, létale à J17 du développement. Le nombre d'érythrocytes matures dans le sang périphérique des embryons mutants est inférieur à 10 %. Hormis cette anémie, les embryons Dnase<sup>-/-</sup> sont normaux. Il semble donc que des macrophages déficients en Dnase II perdent leur capacité de soutenir l'érythropoïèse définitive. On sait toutefois que le profil de production de cytokines par les macrophages change après la phagocytose de cellules apoptotiques, il est donc possible que les macrophages qui contiennent de l'ADN non digéré produisent des cytokines qui inhibent l'érythropoïèse définitive. Enfin, la dégradation de l'ADN qui suit l'énucléation est dépendante de la voie de signalisation MEK1-JNK puisque les souris invalidées pour l'activité kinase de MKK1 présentent un phénotype similaire à celui des souris Dnase<sup>-/-</sup> [24].

### La maturation du réticulocyte en érythrocyte

Après énucléation, les réticulocytes nouvellement formés vont compléter leur maturation avant de passer dans la circulation sanguine. Sur une période de quelques jours, ils perdent progressivement la réticuline, leurs vacuoles, remodelent leur membrane et changent de forme. La perte des organelles et autres composants de la cellule s'effectue par deux processus : par fusion des vésicules avec la membrane plasmique et externalisation de leur contenu, ainsi que par exocytose du contenu des vacuoles. Des cultures *in vitro* d'érythroblastes de souris infectées par le virus FVA ont permis d'établir la chronologie des étapes de la maturation du réticulocyte [25]. On observe une dégradation rapide des ribosomes et des ARN accompagnée par un déclin de la synthèse de l'hème. Plus tardivement, les mitochondries sont dégradées après bourgeonnement de leurs membranes et fusion avec les vacuoles intracellulaires. Pendant cette période, le taux d'expression de Bcl-x<sub>l</sub> décroît pendant que celui de Bax reste stable ; la dégradation concomitante de la machinerie apoptotique empêche l'apoptose de se produire. Les caspases ne semblent donc jouer aucun rôle dans le remodelage qui accompagne la maturation terminale de l'érythrocyte.

Au cours de sa maturation, le réticulocyte subit des remaniements importants de son cytosquelette avec une perte des récepteurs à la transferrine et la synthèse de la protéine 4.R capable de former des complexes ternaires avec la spectrine et l'actine. Il perd sa forme irrégulière et rigide pour devenir une cellule discoïde biconcave de plus petite taille. Le squelette membranaire de l'érythrocyte est organisé en un réseau constitué de courts filaments d'actine, associés à des molécules

longues et flexibles de spectrine. Cette organisation confère à la membrane sa force et sa souplesse nécessaires au maintien de son intégrité dans la circulation sanguine et les microvaisseaux. Des défauts de ces composants sont associés à diverses anémies hémolytiques. Des travaux récents ont montré que les GTPases Rac1 et Rac2 qui possèdent une fonction redondante modulent la dynamique du cytosquelette de l'érythrocyte en maintenant sa flexibilité [26]. En effet, la double invalidation de leurs gènes entraîne une anémie hémolytique périphérique chez la souris. L'observation du squelette de ces érythrocytes montre des agrégats d'actine F avec une irrégularité de l'architecture de la spectrine et une distribution de la bande 3 en « paquets ». On observe également une phosphorylation accrue de l'adducine. Cette protéine associée à l'actine module son association à la spectrine. Le rôle de cette phosphorylation a été étudié dans différents systèmes, notamment au cours de l'apoptose. Il semble que l'adducine phosphorylée devienne une cible de la caspase-3. La forme clivée se dissocie alors du cytosquelette de façon irréversible. Un tel phénomène pourrait rendre compte de la baisse du niveau d'adducine observée chez les souris mutées.

### Conclusion et perspectives

Au cours de l'érythropoïèse, la production de globules rouges nécessaire au maintien de l'oxygénation des tissus est assurée par une balance finement régulée entre apoptose et différenciation des érythroblastes. Nous avons, avec d'autres groupes, montré que la différenciation nécessite une dépolarisation de la mitochondrie et une activation des caspases transitoires par un mécanisme qu'il reste à élucider. Nous proposons un modèle dans lequel le destin des érythroblastes (différenciation versus apoptose) est déterminé en aval de l'activation des caspases par protection de certaines de leurs cibles par des molécules antiapoptotiques. La proximité entre ces deux processus pourrait permettre à l'organisme de s'adapter rapidement à des modifications physiologiques. En situations pathologiques, en particulier les myélodysplasies qui sont caractérisées par un excès d'apoptose et un défaut de maturation, ces mécanismes de régulation pourraient être perturbés. Il reste à identifier l'ensemble des cibles clivées par les caspases, ainsi que celles protégées de leur action lors de la différenciation érythroblastique. Nous avons montré le rôle majeur d'Hsp70 dans la protection de GATA-1 lors de l'activation des caspases. Les mécanismes de protection des autres cibles des caspases restent à déterminer, ainsi que leur rôle précis dans les mécanismes qui conduisent à l'énucléation. ■

### RÉFÉRENCES

1. Zernati Y, Garrido C, Amsellem S, *et al*. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* 2001 ; 193 : 247-54.

2. Ribeil JA, Zermati Y, Vandekerckhove J, *et al*. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 2007 ; 445 : 102-5.
3. Cantor AB, Orkin SH. Transcriptional regulation of erythropoiesis : an affair involving multiple partners. *Oncogene* 2002 ; 21 : 3368-76.
4. Koury MJ, Sawyer ST, Brandt SJ. New insights into erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 2002 ; 9 : 93-100.
5. Arcasoy MO, Jiang X. Co-operative signalling mechanisms required for erythroid precursor expansion in response to erythropoietin and stem cell factor. *Br J Haematol* 2005 ; 130 : 121-9.
6. Richmond TD, Chohan M, Barber DL. Turning cells red : signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol* 2005 ; 15 : 146-55.
7. Wojchowski DM, Menon MP, Sathyanarayana P, *et al*. Erythropoietin-dependent erythropoiesis : New insights and questions. *Blood Cells Mol Dis* 2006 ; 36 : 232-8.
8. Liu Y, Pop R, Sadegh C, Brugnara C, Haase VH, Socolovsky M. Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response *in vivo*. *Blood* 2006 ; 108 : 123-33.
9. De Maria R, Zeuner A, Eramo A, *et al*. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 1999 ; 401 : 489-93.
10. De Maria R, Testa U, Luchetti L, *et al*. Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood* 1999 ; 93 : 796-803.
11. Kolbus A, Pilat S, Husak Z, *et al*. Raf-1 antagonizes erythroid differentiation by restraining caspase activation. *J Exp Med* 2002 ; 196 : 1347-53.
12. Chasis JA. Erythroblastic islands : specialized microenvironmental niches for erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 2006 ; 13 : 137-41.
13. Iavarone A, King ER, Dai XM, Leone G, Stanley ER, Lasorella A. Retinoblastoma promotes definitive erythropoiesis by repressing Id2 in fetal liver macrophages. *Nature* 2004 ; 432 : 1040-5.
14. Hanspal M, Smockova Y, Uong Q. Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages. *Blood* 1998 ; 92 : 2940-50.
15. Lee G, Lo A, Short SA, *et al*. Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation. *Blood* 2006 ; 108 : 2064-71.
16. Simmons PJ, Masinovsky B, Longenecker BM, Berenson R, Torok-Storb B, Gallatin WM. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1992 ; 80 : 388-95.
17. Krauss SW, Lo AJ, Short SA, Koury MJ, Mohandas N, Chasis JA. Nuclear substructure reorganization during late-stage erythropoiesis is selective and does not involve caspase cleavage of major nuclear substructural proteins. *Blood* 2005 ; 106 : 2200-5.
18. Leung CG, Xu Y, Mularski B, Liu H, Gurbuxani S, Crispino JD. Requirements for survivin in terminal differentiation of erythroid cells and maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells. *J Exp Med* 2007 ; 204 : 1603-11.
19. Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC. Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. *J Cell Biol* 1989 ; 109 : 3005-13.
20. Lee JC, Gimm JA, Lo AJ, *et al*. Mechanism of protein sorting during erythroblast enucleation : role of cytoskeletal connectivity. *Blood* 2004 ; 103 : 1912-9.
21. Yoshida H, Kawane K, Koike M, Mori Y, Uchiyama Y, Nagata S. Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature* 2005 ; 437 : 754-8.
22. Sani S, Bala S, Gwynn B, Sahr KE, Peters LL, Hanspal M. Absence of erythroblast macrophage protein (Emp) leads to failure of erythroblast nuclear extrusion. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 20181-9.
23. Kawane K, Fukuyama H, Kandoh G, *et al*. Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science* 2001 ; 292 : 1546-9.
24. Bonnesen B, Orskov C, Rasmussen S, *et al*. MEK kinase 1 activity is required for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Blood* 2005 ; 106 : 3396-404.
25. Koury MJ, Koury ST, Kopsombut P, Bondurant MC. *In vitro* maturation of nascent reticulocytes to erythrocytes. *Blood* 2005 ; 105 : 2168-74.
26. Kalfa TA, Pushkaran S, Mohandas N, *et al*. Rac GTPases regulate the morphology and deformability of the erythrocyte cytoskeleton. *Blood* 2006 ; 108 : 3637-45.