



HAL
open science

Homéostasie du fer et traitement différenciant des leucémies aiguës myéloblastiques

Céline Callens

► **To cite this version:**

Céline Callens. Homéostasie du fer et traitement différenciant des leucémies aiguës myéloblastiques. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2010. Français. NNT: . tel-00462511

HAL Id: tel-00462511

<https://theses.hal.science/tel-00462511>

Submitted on 10 Mar 2010

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°

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

Céline CALLENS

Née le 22 mars 1977 à LAVELANET

Le 17 février 2010

**HOMEOSTASIE DU FER ET TRAITEMENT DIFFERENCIANT
DES LEUCEMIES AIGUES MYELOBLASTIQUES**

JURY

Président :	M. le Professeur Christian AUCLAIR
Rapporteur :	M. le Professeur Pierre FENAUX
Rapporteur :	M. le Professeur Didier BOUSCARY
Examineur :	Mme le Docteur Carole BEAUMONT
Examineur :	M. le Professeur Hugues DE THE
Directeur de thèse :	M. le Professeur Olivier HERMINE

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur C. Auclair,

*Pour l'honneur que vous me faites en acceptant la présidence de ce jury,
Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect et de ma gratitude.*

A Monsieur le Docteur M. Dy,

*Pour avoir eu la gentillesse de m'accueillir dans votre laboratoire,
Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.*

A Monsieur le Professeur P. Fenaux,

*Pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail,
Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.*

A Monsieur le Professeur D. Bouscary,

*Pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail,
Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.*

A Monsieur le Professeur H. De Thé,

*Pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail,
Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.*

A Madame le Docteur C. Beaumont,

*Pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail,
Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance*

A Monsieur le Professeur O. Hermine,

*Pour avoir eu la gentillesse d'accepter de diriger cette thèse,
Pour ton accueil si chaleureux à un moment où la recherche ne me semblait pas une évidence,
Pour la confiance que tu as toujours accordée à mon travail,
Cette thèse est pour moi l'occasion de t'exprimer mes remerciements les plus sincères et ma plus grande admiration.*

A Monsieur le Docteur Ivan Cruz Moura,

*Pour avoir eu la gentillesse d'accepter d'encadrer cette thèse,
Pour m'avoir tant appris en si peu de temps, avec autant d'opiniâtreté,
Pour la confiance que tu as toujours accordée à mon travail,
Cette thèse est pour moi l'occasion de t'adresser mes remerciements les plus sincères.*

A toute l'équipe du labo « OH »,

Séverine, pour ton aide si précieuse, tes conseils toujours pertinents et notre solidarité tellement indispensable pour faire face à un Ivan toujours plus exigeant. Evidemment, je n'oublie pas les « extra labo » passés ensemble (trop rares d'ailleurs) que ce soit un apéro-poster à Berlin ou nos soirées roscofiennes. Vas-y francky, c'est bon...

Julie, pour ta sagesse, nos nombreuses discussions...et toutes nos escapades scientifiques « en couple » au bord de la mer.

Amédée, mon anarchiste préféré, Pierre, la force tranquille et Sébastien, le petit teigneux avec un cœur gros comme ça, pour toutes nos révolutions cristallines puis breguetiennes.

Michael, Miiiike ! pour tes nombreux coups de main et ta bonne humeur. A nous le manteau !

Anne et Dani, pour la grande époque du labo franco-brésilien,

Pascaline, Sophie-mast et Anne-Sophie pour tous les bons moments passés ensemble.

Jean-Antoine, fournisseur officiel de chélateurs de fer.

Joëlle, technicienne de choc dans tous les sens du terme (pauvre porte de frigo...).

A toute l'équipe du labo « Moura » et de Bichat

Houda, la reine du blot,

Meetu et Saurabh, les pros du clonage,

Jérôme, le papa des souris, Pamela, la maman des souris et Damien et Etienne, les tontons des souris, pour votre aide précieuse avec ces petites bêtes malodorantes et pas toujours commodes,

Marc Benhamou, pour ta patience avec Ivan et toutes les relectures de notre article.

A mes nouveaux collègues « chercheurs » du laboratoire d'Hématologie de l'hôpital Necker,

Elizabeth pour m'avoir accueillie dans son équipe,

Vahid, plutôt grande gueule mais toujours de bon conseil,

Raouf, pour tes nombreux délires qui font toujours retomber la pression, nos débats d'idées à l'Atelier ou ailleurs, sans oublier Dirty Dancing.

Sandrine, Saïda et Ludo pour l'aide et le soutien que vous m'avez apporté.

A toutes les personnes qui m'ont aidée et soutenue dans ce travail,

Hervé, Nicolas et Emmanuel, les hématos de Saint Louis, sans qui ce travail n'aurait jamais pu être réalisé,

Olivia, Marie-Thérèse, Felipe et Bénédicte, les Hématos de Necker, qui ont concrétisé ce projet,

Jean-Michel, super moléculaire toujours de bon conseil,

Isabelle, ma copine cytogénéticienne.

A mes amis,

Fred, mon éternel binôme qui continue à suivre mes aventures depuis Amiens,

Betsy, la chercheuse la plus speed que je connaisse (c'est trop loin Miami !),

FX, le meilleur DJ sur Terre (si, si !) et mon plus fidèle binôme de concert,

Karim, qui m'a initié à la recherche et m'a transmis cette passion,

Marie, ma grande sœur marseillaise

Dorothee, ma voix de la sagesse

A Gilles,

Pour toutes les étapes que nous avons su franchir ensemble depuis si longtemps,

Pour la motivation dont nous avons besoin mutuellement chaque jour,

Pour tous les bons moments qu'il nous reste à passer ensemble...

A ma famille,

Maman, Delphine, Jean-Jérôme, Antoine et Maxime pour le respect que vous accordez à mon travail et ces bonheurs « tout simples » passés avec vous,

Papa, pour les qualités, les passions, et sûrement les défauts que tu as su me transmettre, dommage que tu ne sois plus là pour que nous profitions des bons moments ensemble...

SOMMAIRE

SOMMAIRE	4
ABREVIATIONS.....	6
INTRODUCTION	9
1. Les leucémies aigües myéloblastiques.....	9
1.1. Définition-Epidémiologie.....	9
1.2. Description clinico-biologique.....	10
1.3. Etat actuel des connaissances sur la leucémogénèse	16
1.4. Traitement classique des LAM	24
2. Le rétablissement de la différenciation myélo-monocytaire pour traiter les LAM.....	32
2.1. Acteurs physiologiques de la différenciation myélo-monocytaire.....	32
2.2. Blocage de la différenciation granuleuse et rétablissement par traitement différenciant : le cas de la LAP	39
2.3. Induction de la différenciation monocytaire par la vitamine D et ses dérivés	45
3. Le ciblage de l'homéostasie du fer en cancérologie	56
3.1. Le cycle du fer.....	56
3.2. Le métabolisme du fer dans les cellules cancéreuses	61
3.3. Propriétés antitumorales des chélateurs de fer.....	64
3.4. Les autres moyens de cibler l'homéostasie du fer.....	70
TRAVAIL DE THESE.....	79
1. Contexte des recherches et introduction du travail de thèse.....	79
2. Manuscrit de l'article soumis sous sa forme révisée à The journal of Experimental Medicine	80
3. Discussion des résultats et perspectives	135
DISCUSSION GENERALE	138
1. Conséquences cellulaires de la perturbation de l'homéostasie du fer.....	138

1.1.	Propriétés antitumorales de la privation en fer.....	138
1.2.	Privation en fer et différenciation cellulaire	140
1.3.	Les ROS dans l'hématopoïèse.....	141
1.4.	Différenciation et microARN	146
1.5.	Privation en fer et éradication des cellules souches leucémiques.....	147
2.	Intérêts de la chélation en fer dans les hémopathies malignes.....	149
2.1.	Origines de la surcharge en fer chez les patients myélodysplasiques	149
2.2.	Prise en charge thérapeutique de la surcharge en fer	150
2.3.	Surcharge en fer et risque infectieux	152
2.4.	Surcharge en fer et allogreffe de moelle.....	153
2.5.	Surcharge en fer et instabilité génomique	154
2.6.	Vers un protocole clinique ?.....	155
	BIBLIOGRAPHIE.....	158
	ANNEXES.....	186
1.	Annexe 1 : Human erythroleukemia : is the two-hit model of mouse leukemogenesis valid in the human disease ?.....	186
2.	Annexe 2 : Recent advances in adult T-cell leukemia therapy: focus on a new anti-transferrin receptor monoclonal antibody.....	190
3.	Annexe 3 : Polymeric IgA1 controls erythroblast proliferation and accelerates erythropoiesis recovery in anemia	198

ABREVIATIONS

Ac : Anticorps

ADCC : Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity

ALFA : Acute Leukemia French Association

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ATLL : Leucémie Aigüe / Lymphome T lié au virus HTLV1

ATRA : Acide Tout Trans Rétinoïque

CALGB : Cancer and Leukemia Group B

CBF : Core Binding Factor

CDC : Complement Dependent Cytotoxicity

CDK : Cyclin Dependent Kinase

CFU-G : Granulocyte Colony Forming Unit

CFU-GM : granulocyte-monocyte Colony Forming Unit

CFU-M : Monocyte Colony Forming Unit

CKI : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor

CLP : Progéniteur Lymphoïde Commun

CSL : Cellule Souche leucémique

DFO : Deferoramine (DEFERAL®)

DFX : Deferasirox (EXJADE®)

DMSO: Diméthylsulfoxyde

EHA : European Hematology Association

FAB : french American British

FISH : Hybridation In situ Fluorescente

G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor

GFM : Groupe Français des Myélodysplasies

GM-CSF : Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor

GMP : Progéniteur granulo-monocytaire commun

GN : Nitrate de Gallium

GVH : Graft *Versus* Host

GVL : Graft *Versus* Leukemia

HDAC : Histone déAcétylase

IC50 : Concentration Inhibitrice 50%

Ig : Immunoglobuline

IRE : Iron Regulatory Element

IRP : iron Pegulatory Protein

Ko : knock-out

LA : Leucémie Aiguë

LAM : leucémie Aigüe Myéloblastique

LAP : Leucémie Aigüe Promyélocytaire

LMP : Progéniteur commun Myéloïde Lymphoïde

MDS : Myélodysplasie

MiR : MicroARN interférant

MRC : Medical research Council

NAC : N-Acétylecystéine

nVDRE : negative Vitamin D Receptor Element

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PDTC : Pyrrolidine DiThioCarbamate

RAR : Récepteur de l'Acide Rétinoïque

RC : Rémission Complète

ROS : Reactive Oxygen Species

RR : Ribonucléotide Réductase

RTf : Récepteur de la transferrine

SMD : Syndrome Myélodysplasique

SNC : Système Nerveux Central

Tf : transferrine

TfR : Transferrin receptor

VD : Vitamine D

VDIR : Vitamin D Receptor Interacting Element

VDR : Vitamin D Receptor

VDRE : Vitamin D Receptor Element

INTRODUCTION

1. Les leucémies aiguës myéloblastiques

1.1.Définition-Epidémiologie

Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) constituent un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisées par l'expansion clonale de cellules immatures (blastes) appartenant à la lignée myéloïde bloquées dans leur différenciation et ayant perdu leur capacité à répondre aux régulateurs de la prolifération¹. Elles ont pour origine soit la transformation d'une cellule souche, soit celle d'un progéniteur hématopoïétique myéloïde plus ou moins engagé dans un lignage. Les LAM sont des affections rares, atteignant 3 individus pour 100 000 par an de tous âges et des deux sexes. On observe un pic de fréquence en dessous de 5 ans chez l'enfant et une augmentation régulière de fréquence avec l'âge chez l'adulte.

Des maladies génétiques sont reconnues comme associées à un risque élevé de développer une LAM chez l'enfant essentiellement : ce sont la trisomie 21, le syndrome de Bloom, l'anémie de Fanconi, la neurofibromatose... Certains facteurs de risque acquis favorisant la survenue des LAM ont également été identifiés tels que l'exposition au benzène, aux radiations ionisantes ou à certaines chimiothérapies. La cigarette est la cause la plus commune d'exposition au benzène. Fumer augmente de 1,2 à 2,3 fois le risque de développer une LAM ; ce risque étant particulièrement fort chez les fumeurs réguliers^{2,3}. Pour ce qui est des radiations ionisantes, les survivants des bombes atomiques ont un risque très fort d'être atteint de LAM. Ainsi, Nakanishi a montré que les anomalies des chromosomes 5 et 7, retrouvées fréquemment dans les blastes de LAM, sont beaucoup plus fréquentes chez les patients nés après 1945 que chez ceux n'ayant pas été exposés à la bombe atomique⁴. Il semblerait également que le personnel de bord des avions ait un risque plus important de développer une LAM du fait de l'exposition aux radiations ionisantes⁵. Dix à quinze pourcents des patients atteints de LAM ont reçu auparavant une chimiothérapie cytotoxique, le plus souvent pour traiter une tumeur solide. On distingue dans ce cas deux grands types de LAM secondaires : celles qui surviennent 5 à 10 ans après une exposition aux agents alkylants, les blastes portent alors souvent des anomalies des bras longs des chromosomes 5 et 7 ; et celles qui se développent 1 à 5 ans après un traitement utilisant des drogues interagissant avec la topoisomérase II telles que la doxorubicine ou l'etoposide. L'anomalie cytogénétique la plus fréquente touche alors le bras long du chromosome 11 où se situe le gène MLL. Dans ce type de LAM secondaire, on peut voir également des translocations équilibrées telles que la t(8;21) ou la t(15;17), typique de la leucémie aiguë promyélocytaire.

Le nombre de personnes exposées à l'un ou l'autre des ces facteurs favorisant excède largement le nombre de celles qui développent effectivement une LAM, vraisemblablement du fait d'une grande variabilité d'autres facteurs impliqués, intra et interindividuels.

1.2. Description clinico-biologique

Les signes cliniques des LAM sont divers et non-spécifiques mais pour la plupart d'entre eux sont directement attribuables à l'envahissement médullaire par les blastes leucémiques. Non seulement ceux-ci sont incapables de produire des cellules matures fonctionnelles mais en plus, leur prolifération incontrôlée au niveau de la moelle osseuse empêche les progéniteurs sains résiduels de proliférer et maturer correctement. Ceci se traduit donc par une insuffisance médullaire entraînant une anémie, une neutropénie et une thrombopénie¹. Classiquement, les patients souffrent alors d'asthénie, de fièvre, d'hémorragies et sont susceptibles aux infections. D'autres symptômes peuvent être attribués à l'infiltration par les blastes du foie, de la rate, de la peau, des ganglions, des os, des gencives, du système nerveux central. Une grande hyperleucocytose (> 100 000/mm³) peut entraîner un phénomène de leucostase se manifestant par des troubles de la respiration, de la vue, du système nerveux central ou de la coagulation. Parfois, mais assez rarement au moment du diagnostic, on peut observer des anomalies métaboliques à type d'hyperuricémie, d'hyperphosphorémie ou d'hypocalcémie⁶.

Le diagnostic de leucémie aigüe (LA) repose essentiellement sur la mise en évidence de l'accumulation médullaire de blastes myéloïdes du fait de leur incapacité à maturer. Historiquement, les différents types de LAM ont été décrits dans la classification FAB (French-American-British, **figure 1**)⁷. Dans ce système, la LA est certaine lorsque la moelle contient au moins 30% de blastes.

<u>FAB subtype</u>	<u>Common name (% of cases)</u>
M0	Acute myeloblastic leukemia with minimal differentiation (3%)
M1	Acute myeloblastic leukemia without maturation (15-20%)
M2	Acute myeloblastic leukemia with maturation (25-30%)
M3	Acute promyelocytic leukemia (5-10%)
M4	Acute myelomonocytic leukemia (20%)
M4éo	Acute myelomonocytic leukemia with abnormal eosinophils (5-10%)
M5	Acute monocytic leukemia (2-9%)
M6	Erythroleukemia (3-5%)
M7	Acute megakaryocytic leukemia (3-12%)

Figure 1 : La classification FAB des LAM (d'après B. Löwenberg *et al.* New England Journal of Medicine 1999).

En 2001, la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), incorporant en plus des données de cytogénétiques et subdivisant les LAM en 4 grandes catégories, a baissé à 20% le pourcentage de blastes médullaires minimum pour poser le diagnostic de LAM (**figure 2**). Cette nouvelle classification a ainsi inclus dans les LAM certains cas de syndromes myélodysplasiques de haut grade que la classification FAB ne prenait pas en compte, renforçant l'idée d'un chevauchement entre ces deux pathologies.

Panel: WHO classification of AML

Recurrent genetic abnormalities
t(8;21)(q22;q22), (RUNX1T1;RUNX1)
Abnormal bone marrow eosinophils and inv(16)(p13q22) or t(16;16)(p13;q22), (CBFB;MYH11)
Acute promyelocytic leukaemia with t(15;17)(q22;q11-21), (PML;RARA) and variants 11q23 (MLL) abnormalities

Multilineage dysplasia
Following a myelodysplastic syndrome (MDS)/myeloproliferative disease (MPD)
Without antecedent MDS or MDS/MPD, but with dysplasia in at least 50% of cells in two or more myeloid lineages

Therapy related AML and myelodysplastic syndromes
Alkylating-agent or radiation-related type
Topoisomerase-II-inhibitor-related type (some may be lymphoid)
Other types

Not otherwise categorised
Minimally differentiated AML
AML without maturation
AML with maturation

Acute myelomonocytic leukaemia
Acute monoblastic and monocytic leukaemia
Acute erythroid leukaemias (erythroid or myeloid and pure erythroleukaemia)
Acute megakaryoblastic leukaemia
Acute basophilic leukaemia
Acute pancytopenia with myelofibrosis
Myeloid sarcoma

Acute leukaemia of ambiguous lineage
Undifferentiated acute leukaemia

Bilineal acute leukaemia
Biphenotypic acute leukaemia

Reproduced with permission from IARC Press *

Figure 2 : Classification OMS 2001 des LAM (E. Estey et H. Döhner, The Lancet 2006).

Une forme révisée de cette classification a été publiée en 2008 où le nombre d'entités leucémiques avec anomalie génétique récurrente a encore grandi du fait de l'identification de nouvelles anomalies cytogénétiques (**figure 3**).

AML with recurrent genetic abnormalities
AML with t(8;21)(q22;q22);(<i>RUNX1-RUNX1T1</i>)
AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22);(<i>CBFB-MYH11</i>)
APL with t(15;17)(q22;q12);(<i>PML-RARA</i>)
AML with t(9;11)(p22;q23);(<i>MLLT3-MLL</i>)
AML with t(6;9)(p23;q34);(<i>DEK-NUP214</i>)
AML with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2);(<i>RPN1-EVI1</i>)
AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13;q13);(<i>RBM15-MKL1</i>)
Provisional entity: AML with mutated <i>NPM1</i>
Provisional entity: AML with mutated <i>CEBPA</i>
AML with myelodysplasia-related changes
Prior history of myelodysplastic syndrome (MDS)
MDS-related cytogenetic abnormality
Multilineage dysplasia
Therapy-related myeloid neoplasms
Acute myeloid leukemia, not otherwise specified
AML with minimal differentiation
AML without maturation
AML with maturation
Acute myelomonocytic leukemia
Acute monoblastic/monocytic leukemia
Acute erythroid leukemia
Acute megakaryoblastic leukemia
Acute basophilic leukemia
Acute panmyelosis with myelofibrosis

Figure 3 : Aperçu de la classification OMS 2008 des LAM (D'après Weinberg *et al.* Blood 2009).

Les blastes sont identifiés et comptés sur un frottis de moelle coloré au May-Grünwald-Giemsa. Ce sont le plus souvent des cellules de taille moyenne, au noyau plus ou moins régulier à chromatine fine, avec de nombreux nucléoles. Le cytoplasme, assez peu abondant, est nettement basophile et contient fréquemment des granules azurophiles, parfois des corps d'Auer (**figure 4**). La cyto-morphologie de tous les lignages doit être observée méthodiquement de manière à identifier les cas de LAM associés ou secondaires à une myélodysplasie, qui sont de plus mauvais pronostic du fait d'une réponse au traitement médiocre. Une fois le critère d'un minimum de 20% de blastes médullaires rempli, il reste à confirmer leur appartenance au lignage myéloïde. Ainsi, par technique d'immunophénotypage, au moins 20% des blastes doivent exprimer les marqueurs de surface CD13 ou CD33 associés à la différenciation myéloïde.

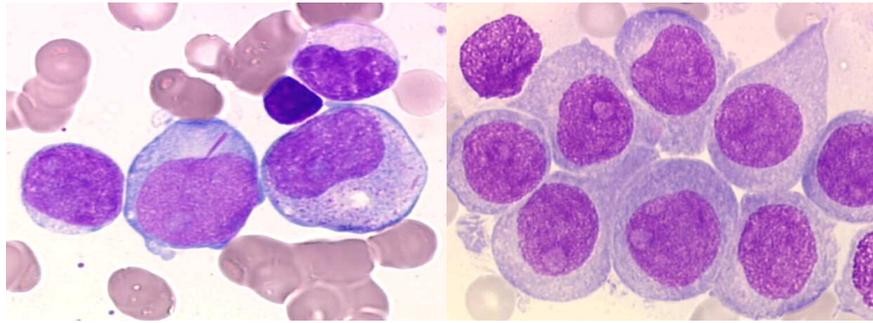


Figure 4 : photographies de frottis médullaires colorés au MGG. A gauche, blastes de LAM2. A droite, blastes de LAM5.

Ce diagnostic morphologique est toujours complété par des analyses cytogénétiques par caryotype et hybridation *in situ* fluorescente (FISH). En effet, des anomalies chromosomiques clonales acquises, c'est-à-dire une anomalie structurale ou une trisomie observée dans au moins deux cellules en métaphase, ou une monosomie observée dans au moins trois cellules en métaphase, sont détectées au diagnostic chez 50 à 60% des patients atteints de LAM *de novo*. Chez 10 à 20% des patients, le caryotype est complexe ; ce qui signifie qu'au moins trois anomalies cytogénétiques ont été décelées, tandis que chez 50 à 60% des patients, aucune anomalie cytogénétique n'est détectée par la technique en bandes classique⁸. Les analyses par FISH prennent alors toute leur importance, pour détecter les anomalies de la région 11q23 impliquant le gène MLL par exemple.

Plusieurs groupes coopérateurs ont proposé une classification des LAM basée sur la cytogénétique définissant trois catégories pronostiques des LAM : les LAM de bon pronostic, les LAM de mauvais pronostic, et celles de risque intermédiaire (**figure 5**). Toutes les anomalies n'ont pas la même « valeur » selon les études, mais le risque attribué à certaines d'entre-elles est sans équivoque. Toutes les études sont d'accord pour dire que les patients présentant une translocation $t(15;17)(q22;q12-21)$ ont un très bon pronostic, et ceux présentant une translocation $t(8;21)(q22;q22)$ ou une $inv(16)/t(16;16)(p13q22)$ ont un bon pronostic. A l'opposé, les inversions du chromosome 3 ($q21q26$) et les caryotypes complexes sont associés à un très mauvais pronostic. Il faut noter que la catégorie « caryotype complexe » n'inclue pas les $t(15;17)$, $t(8;21)$, $inv(16)$, $t(16;16)$ et $t(9;11)$ car leur pronostic n'est généralement pas affecté de manière péjorative par la survenue d'anomalies supplémentaires. Dans le même ordre d'idée, les patients -5, $del(7q)$, $-17/17p-$, -18 ou -20 dont le pronostic est mauvais, ont toujours un caryotype complexe, si bien qu'il est difficile d'évaluer la valeur de chacune de ces anomalies individuellement⁸.

Risk Category	MRC [3]	SWOG/ECOG [39]	CALGB [40,41]
Favorable "good risk"	t(8;21) inv(16)/t(16;16) t(15;17)	t(8;21) without del(9q) or complex karyotype inv(16)t(16;16)/del(16q) t(15;17)	t(8;21) inv(16)/t(16;16) del(9q)
Intermediate	Normal karyotype del(7q) el(9q) Trisomy 8 abn(11q23) +21; +22 All other aberrations	Normal karyotype Trisomy 8 del(12p) Trisomy 6 -Y	Normal karyotype -Y del(5q) del(7q) t(9;11) +11, +13, +21 del(11q)
Unfavorable "poor risk"	abn(3q) -5/del(5q) -7 ≥ 5 aberrations	abn(3q) -5/del(5q) t(6;9) -7/del(7q) t(9;22) abn(9q), abn(11q), abn(17p), abn(20q), abn(21q)	Inv(3)/t(3;3),t(6;9) t(6;11) -7 +8 or one additional aberration t(11;19) ≥ 3 aberrations

Abbreviations: CALGB, Cancer and Leukemia Group B; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; MRC, Medical Research Council; SWOG, Southwest Oncology Group.

Figure 5 : Groupes de risque cytogénétique dans les LAM (Weinberg *et al.* Blood 2009).

Il faut noter toutefois que toutes ces études ont été réalisées en incluant exclusivement ou majoritairement des patients âgés de moins de 60 ans. D'autres études se sont intéressées à la valeur des anomalies cytogénétiques dans les LAM des sujets âgés, qui globalement sont toujours de moins bon pronostic que celle des sujets jeunes. Ces études confirment que le caryotype a également une valeur pronostique indépendante chez les sujets âgés, mais certaines anomalies n'ont plus la même valeur. Ainsi, une étude du groupe MRC (Medical Research Council) au Royaume-Uni montre que le devenir des patients âgés ayant moins de 5 anomalies (à l'exclusion des anomalies du chromosome 5, du chromosome 7 et du bras long du chromosome 3) est comparable à celui des patients à caryotype normal ou ayant des anomalies de risque intermédiaire⁹. De ce fait, ils sont inclus dans le groupe de risque intermédiaire et seuls persistent dans le groupe de haut risque les patients ayant plus de 5 anomalies. Une étude du groupe CALGB (Cancer And Leukemia Group B) aux Etats-Unis confirme la valeur péjorative des caryotypes à 5 anomalies ou plus chez les sujets âgés, aucun patient n'ayant survécu plus de 5 ans après le diagnostic¹⁰. Dans une communication orale récente (congrès de l'EHA à Berlin en 2009), D. Grimwade a soulevé le problème de la classification des anomalies génétiques rares (incidence individuelle <2%) qui concernent environ 10% des patients LAM et qui sont classées soit de risque intermédiaire soit de mauvais pronostic. L'étude de 5635 patients âgés de 16 à 59 ans inclus dans les protocoles du MRC montre que les patients porteurs de la translocation t(3;5) fusionnant les gènes NPM1 et MLF1 ont le même devenir que les patients ayant un caryotype normal alors que cette anomalie était considérée jusqu'à lors de mauvais pronostic. Cette analyse confirme l'hétérogénéité de valeur pronostique des anomalies de MLL, tout dépend en fait du gène partenaire. En analyse multivariée, un certain nombre d'anomalies sont associées de manière significative à un mauvais pronostic : ce sont les anomalies en 3q, en 17p, les anomalies touchant le chromosome 5, la t(6;11), la t(10;11) ou la t(9;22). Les patients qui

n'ont pas ces anomalies mais qui ont plus de 3 autres anomalies ont un mauvais pronostic. En conséquence, D. Grimwade propose de réviser la classification cytogénétique des LAM au sein du groupe MRC.

Les techniques de cytogénétique sont donc désormais indispensables au bilan diagnostique des LAM puisqu'elles auront un impact certain sur le type de traitement administré en fonction des anomalies de bon ou de mauvais pronostic qui auront été identifiées. Il n'en demeure pas moins que la majorité des patients ont un caryotype normal et sont classés dans la catégorie de risque intermédiaire. Pourtant, il est apparu clairement dans plusieurs études que tous ces patients ne retirent pas le même bénéfice d'un même traitement du fait d'une grande hétérogénéité de leur maladie. Ainsi, depuis une dizaine d'années, de nombreuses mutations ou absence de mutations de gènes et/ou des variations d'expression de gènes ayant un impact pronostique ont été découvertes¹¹. Leur étude a permis de mieux comprendre cette hétérogénéité de réponse au traitement au sein des LAM à caryotype normal mais a aussi largement contribué à une description beaucoup plus précise des étapes de la leucémogénèse.

1.3. Etat actuel des connaissances sur la leucémogénèse

L'étude des mécanismes de leucémogénèse a nettement progressé ces dix dernières années et repose désormais sur deux concepts essentiels. D'une part, il existerait dans les leucémies aigües, comme dans les tumeurs solides, des cellules souches leucémiques (CSL)¹². Les CSL sont caractérisées par leur propriété d'autorenouvellement et leur capacité à donner naissance aux progéniteurs leucémiques qui produisent eux-mêmes de grandes quantités de blastes. La plupart des études rapportent que les CSL sont quiescentes ou se divisent très lentement alors que les progéniteurs leucémiques prolifèrent très rapidement¹³. Les chimiothérapies classiques permettent d'obtenir des rémissions complètes car elles atteignent facilement le « bulk » leucémique en prolifération, mais le taux élevé de rechute dans les LAM pourrait découler du fait que ces traitements ne permettent pas l'éradication des CSL quiescentes. D'autre part, Le processus de leucémogénèse est multi-étapes. En effet, plusieurs études épidémiologiques et génotypiques ont clairement montré que les cellules de LAM portent toujours plusieurs anomalies, que ce soit des mutations ponctuelles, des translocations équilibrées, ou d'autres anomalies¹⁴. Les modèles murins vont d'ailleurs dans ce sens, puisque les souris transgéniques PML-RARA (équivalent de le t(15;17) dans la leucémie aigüe promyélocytaire) ne développent une LAM qu'après une longue période de latence (six mois ou plus) avec une pénétrance incomplète (15 à 30%), suggérant la survenue nécessaire d'un second évènement^{15,16}. De même, le développement d'une érythroleucémie murine nécessite l'enchaînement de deux étapes. La première correspond à la surexpression du facteur de transcription Pu-1 et provoque un blocage de maturation des érythroblastes

tandis que la deuxième anomalie qui est une mutation activatrice de c-kit permet l'excès de prolifération¹⁷. La transposition à l'homme de ces modèles murins doit cependant être faite avec prudence, notre équipe a ainsi montré que les anomalies moléculaires survenant chez l'homme et aboutissant à la même leucémie peuvent être différentes (**ANNEXE 1**). Les modèles murins « mono-étapes » ont tout de même l'avantage de nous avoir éclairés sur les conséquences de ces anomalies individuellement. Ainsi, la présence isolée de la t(8;21) ou de l'inv(16) aboutit à un blocage de maturation myéloïde sans développement d'une leucémie franche¹⁸, alors que l'activation constitutive de Ras ou FLT3 par mutation provoque le développement d'un syndrome myéloprolifératif¹⁹. Enfin, les travaux de Greaves ajoutent un argument de plus à ce modèle multi-étapes car ils ont mis en évidence la présence de translocations associées aux leucémies telles que la t(4;11) fusionnant les gènes MLL et AF4 ou la t(12;21) fusionnant les gènes TEL et AML1 durant le développement dès le stade *in utero*. Ces patients n'ont développé une LAM que beaucoup plus tardivement, indiquant à nouveau qu'il était nécessaire que d'autres anomalies surviennent²⁰. Prenant en compte toutes ces observations, Gilliland a proposé en 2001 un modèle de leucémogénèse en deux étapes, où les anomalies de classe I confèrent un avantage de prolifération et de survie aux blastes leucémiques tandis que les anomalies de classe II aboutissent au blocage de la maturation et permettent l'autorenouvellement des cellules leucémiques, ces deux groupes d'anomalies étant complémentaires pour le développement d'une LAM²¹.

Parmi les anomalies de type I, se trouvent essentiellement des mutations de gènes entraînant l'activation constitutive aberrante d'une voie de signalisation. L'ensemble des mutations classées dans cette catégorie sont retrouvées dans environ 50% des LAM mais il est tout à fait exceptionnel que deux de ces anomalies soient associées chez un même patient. Cette observation épidémiologique confirme qu'elles forment bien un groupe de complémentarité où n'importe quelle anomalie est suffisante isolément à conférer un avantage de prolifération et de survie.

- FLT3 est le gène le plus fréquemment muté dans les LAM puisque son activation constitutive est retrouvée dans 30 à 35% des LAM. Dans 20 à 25% des cas se produit une duplication en tandem de quelques uns à plus de 50 acides aminés dans le domaine juxta-membranaire de ce récepteur à tyrosine kinase. Ces duplications (FLT3-ITD) sont toujours « in frame » et aboutiraient à la perte de fonction d'un domaine auto-inhibiteur. Des analyses structurales récentes sont en faveur de cette hypothèse car les duplications surviennent toujours dans une région où 7 acides aminés du domaine juxta-membranaire s'intercalent dans la boucle d'activation. La duplication provoquerait une modification de structure et l'activation non régulée de l'activité tyrosine kinase. Dans 5 à 10% des cas, des mutations ponctuelles touchent la boucle d'activation (FLT3-TKD)¹⁴. La plus fréquente est la mutation D835Y (50% des cas de mutation de FLT3) mais d'autres

mutations plus rares ont déjà été décrites touchant différents acides aminés telles que la Y842C, la K633Q ou la V592A. Certaines mutations surviennent aussi dans le domaine juxta-membranaire ²². Toutes ces mutations permettent l'accès non régulé de l'ATP et du substrat au site catalytique du récepteur. Les deux types de mutations (FLT3-ITD et TKD) sont très rarement associés sur le même allèle. La plupart des études des LAM adultes et pédiatriques associent les duplications de FLT3 à un mauvais pronostic²³. La valeur pronostique des mutations ponctuelles reste controversée^{24,25}. Comme le montrent les modèles murins, ces mutations confèrent uniquement un avantage de prolifération et de survie. Isolément, elles provoquent un syndrome myéloprolifératif qui n'est pas transplantable dans des receveurs secondaires. Ceci indique que l'activation constitutive de FLT3 ne suffit pas au développement d'une LAM et ne donne pas la capacité d'autorenouvellement. Elle doit donc toujours être associée à une autre anomalie permettant le blocage de maturation et l'autorenouvellement¹⁴.

- C-Kit est un récepteur à tyrosine kinase dont le ligand est le stem cell factor (SCF). 80% des blastes de patients expriment le récepteur c-Kit. Dans 20 à 30% des cas des LAM dites « à core binding factor », c'est-à-dire portant la t(8 ;21) ou l'inv(16), l'exon 8 situé dans la partie extra-cellulaire du récepteur, ou le codon 816, situé dans la boucle d'activation du domaine catalytique, sont mutés. Les mutations du domaine extracellulaire provoquent la dimérisation spontanée du récepteur, son hyperactivation et l'activation des voies de signalisation situées en aval telles que les MAPkinases et la voie PI3kinase. La mutation D816V entraîne l'activation constitutive de STAT3 et l'up-régulation de cibles de STAT3 telles que BCLXL et MYC. De plus, cette mutation active aussi la voie PI3kinase/AKT sans activer la voie RAS. La survenue de mutations dans l'exon 8 de c-Kit augmente le risque de rechute chez les patients t(8 ;21) et inv(16) mais cette mutation est sensible à l'imatinib (GLIVEC®). En revanche, les mutations D816V et D816Y sont hautement résistantes à cet inhibiteur de tyrosine kinase. Elles resteraient sensibles in vitro au PKC412, un inhibiteur de tyrosine kinase dérivé de la staurosporine ²⁶, au dasatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase de deuxième génération²⁷ et à la rapamycine, inhibant mTOR²⁸.
- K-Ras, N-Ras et H-Ras constituent une famille de petites protéines G. La stimulation de nombreux récepteurs à cytokine aboutit à l'activation des protéines RAS leur conférant un rôle important dans la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques. Les mutations des oncogènes N-Ras et K-Ras surviennent dans 25% et 15% des LAM respectivement. Elles touchent

essentiellement les codons 12, 13 et 61 et abrogent l'activité GTPase intrinsèque de ces petites molécules entraînant leur activation constitutive. En l'absence de mutations, l'activation de la voie Ras peut résulter de mutations gain-de-fonction au niveau des récepteurs FLT3 ou c-KIT situés en amont provoquant de la même manière l'accumulation de Ras-GTP. La valeur pronostique des mutations de Ras dans les LAM n'est toujours pas très clairement établie. Cette voie semble toutefois être une cible thérapeutique potentielle car l'activité de Ras nécessite sa translocation à la membrane plasmique *via* une étape de farnésylation et des inhibiteurs de farnésyl-transférase sont actuellement testés cliniquement ²⁶. L'administration de tipifarnib ou de lonafarnib chez des patients naïfs de tout traitement et atteints de LAM, de myélodysplasie ou de leucémie myélomonocytaire chronique a produit des résultats plutôt encourageants alors qu'ils étaient décevants chez les patients atteints de LAM réfractaire ou en rechute ²⁹. Pour exemple, dans un essai de phase II réalisé chez 14 patients atteints de myélodysplasie (MDS) ou de LAM secondaire à une MDS, le lonafarnib a eu une activité très limitée chez 2 patients et a provoqué de nombreux effets secondaires hématologiques et gastro-intestinaux nécessitant une réduction de dose chez tous les patients³⁰. Les résultats d'un essai de phase III utilisant le tipifarnib en première ligne chez des patients âgés atteints de LAM ont été aussi très décevants. L'association de ces molécules à d'autres molécules de chimiothérapie ou à des agents déméthylants est à l'étude²⁹.

- Le gène PTPN11 situé sur le chromosome 12 code une tyrosine phosphatase appelée SHP-2. SHP-2 est fortement exprimée dans les progéniteurs hématopoïétiques et participe à la transduction du signal déclenché par le SCF, l'IL-3, l'IL-6, le GM-CSF et l'EPO. Initialement, des mutations germinales de PTPN11 ont été décrites dans plus de 50% des cas de syndrome de Noonan. Des mutations somatiques de PTPN11 sont présentes également dans environ 35% des cas de leucémie myélomonocytaire juvénile. Dans les LAM, les mutations de PTPN11 sont rares, plus fréquentes dans les cas pédiatriques (4,4%) que chez les adultes (2,6%). Plus de 80% des mutations observées dans les LAM surviennent dans l'exon 3, plus particulièrement (>50% des cas) au niveau des codons 72 et 76. Le rôle exact de ces mutations dans la leucémogénèse reste à élucider, de même que leur valeur pronostique. Elles ne semblent pas être associées à un sous-groupe cytogénétique particulier de LAM. Une étude a rapporté leur plus grande fréquence dans les LAM5 de la classification FAB, mais un autre travail n'a pas confirmé cette observation ²⁵.

- D'autres anomalies, plus rares, peuvent également être rattachées à ce groupe de complémentation. Ainsi, la mutation Jak2 V617F classiquement retrouvée dans 90% des polyglobulies de Vaquez et 50% des thrombocytémies essentielles est rarement décrites dans les LAM (1,6% quel que soit le type), le plus souvent en association à d'autres anomalies caryotypiques (3,6% dans les LAM à CBF). De rares cas de mutations du gène MPL codant le récepteur de la thrombopoïétine ont été rapportés (2%), quasiment toujours dans des LAM secondaires à une myélofibrose avec métaplasie myéloïde. Enfin, des mutations des ubiquitines ligases c-CBL et CBL-b ont été décrites récemment dans les LAM. Elles seraient responsables de l'augmentation d'expression de FLT3, et constitueraient donc un nouveau moyen de dérégulation de cette protéine. Leur prévalence et leur impact clinique reste à déterminer²⁵.

Les anomalies de type II provoquent un blocage de maturation ou confèrent aux cellules la capacité d'autorenouvellement. Elles sont typiquement représentées par les transcrits de fusion impliquant des facteurs de transcription ou des co-activateurs transcriptionnels indispensables au processus de maturation, ou par des mutations de gènes jouant un rôle dans la régulation du cycle cellulaire.

- Le complexe de transcription CBF, constitué des protéines AML1 (appelé aussi RUNX1 ou CBFA2) et CBFb β est indispensable à l'hématopoïèse normale (**figure 6**). Les souris déficientes pour AML1 ou CBFb n'ont pas d'hématopoïèse dans le foie fœtal, ce qui montre bien que ce complexe est essentiel pour l'hématopoïèse définitive de tous les lignages¹⁴. Les anomalies touchant ce complexe sont assez fréquentes dans les LAM et correspondent dans leur grande majorité à des translocations équilibrées. Ainsi, la t(8;21)(q22;q22), fusionnant les gènes AML1 et ETO, et l'inv(16)/t(16;16)(p13q22) fusionnant les gènes CBFb et MYH11, surviennent dans 7% et 8% des LAM respectivement³¹. Dans la t(8;21), les 5 premiers exons d'AML1 sont fusionnés avec la majeure partie du gène ETO. La protéine de fusion qui en résulte contient le domaine Runt d'AML1 lui permettant de se fixer au niveau des promoteurs de plusieurs gènes impliqués dans l'hématopoïèse, et la portion contenant ETO interagissant avec le complexe nucléaire répresseur. Ces interactions aboutissent à une répression transcriptionnelle du fait du recrutement des histones désacétylases et de la configuration de la chromatine en structure « fermée ». De la même manière, l'inv(16) fusionne la majorité de CBFb à la queue de MYH11 et cette protéine de fusion, par recrutement de complexes répresseurs, provoque l'extinction de gènes indispensables à la différenciation hématopoïétique²⁶. De ce fait, ces LAM pourraient particulièrement bénéficier d'un traitement utilisant les

inhibiteurs d'histone déacétylases. La protéine de fusion CBF β -MYH11 peut aussi interférer avec le complexe CBF en séquestrant AML1 dans le cytoplasme³².

De nombreuses études s'accordent à dire que les LAM à CBF sont de bon pronostic^{9,31,33,34}. Ces patients bénéficient particulièrement d'un traitement de consolidation par de fortes doses de cytarabine bien que la raison de cette bonne réponse ne soit pas vraiment élucidée³⁵⁻³⁷. Outre les translocations, AML1 peut également être dérégulé par mutations ponctuelles et amplification²⁵. Le dosage génique intervient donc également dans la dérégulation de facteur de transcription et participe à la leucémogénèse. Aucune de ces anomalies n'est suffisante au développement d'une LAM et doit toujours être associée à un autre évènement favorisant la prolifération.

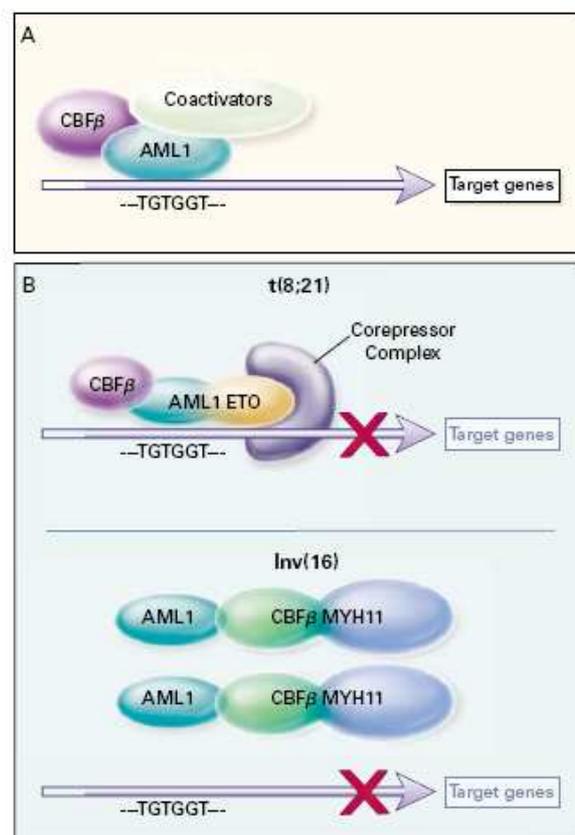


Figure 6 : Le complexe transcriptionnel CBF β -AML1. (A) Dans les cellules normales, le complexe CBF β -AML1 se lie à l'ADN sur la séquence TGTGGT et active la transcription des gènes cibles en recrutant des coactivateurs. (B) Dans les cellules de LAM, la protéine chimérique AML1-ETO interagit avec CBF β , ce complexe se lie à l'ADN mais recrute des corépresseurs empêchant la transcription. La protéine chimérique CBF β -MYH11 séquestre AML1 qui ne peut plus se lier à l'ADN et activer la transcription (B. Löwenberg *et al.* New England Journal of Medicine 1999).

- Parmi les transcrits de fusion impliqués dans les LAM, le transcrit PML-RARA résultant de la t(15 ;17) est probablement le plus connu. La leucémie aigüe promyélocytaire, où comme son nom l'indique, le blocage de maturation survient au stade de promyélocyte, est toujours associée à une translocation chromosomique impliquant RARA le récepteur de l'acide rétinoïque, et l'un des cinq partenaires connus, dont PML est le mieux étudié. Le transcrit de fusion PML-RARA est un dominant négatif de RARA et inhibe tous les gènes cibles de l'acide rétinoïque en recrutant un complexe co-répresseur, comme déjà décrit précédemment pour les autres transcrits de fusion. Cette translocation est de bon pronostic, particulièrement parce que les patients bénéficient d'un traitement avec de l'acide tout-trans-rétinoïque (ATRA) ou du trioxyde d'arsenic (As₂O₃) ciblant la protéine de fusion et rétablissant la maturation physiologique¹⁴. Ce sujet sera beaucoup plus largement détaillé dans la deuxième partie de cette introduction consacrée à la différenciation.
- Le gène MLL localisé en 11q23 est le plus fréquemment altéré dans les LAM, par différents mécanismes, avec par ordre de fréquence, des translocations impliquant plus de 30 partenaires différents, des duplications en tandem et des amplifications. La protéine MLL intervient dans la régulation d'expression des gènes par interaction directe avec l'ADN³⁸. Elle serait également impliquée dans la régulation positive de cascades de signalisation kinase dépendante³⁹. Dans de nombreuses études, les réarrangements de MLL sont associés à un mauvais pronostic⁴⁰. Cette notion mérite d'être nuancée, en commençant par distinguer les réarrangements de MLL et les anomalies cytogénétiques touchant la bande 11q23. Concernant les translocations, la valeur pronostique serait différente en fonction du partenaire : MLL-AF9 serait de bon pronostic en particulier chez les enfants, tandis que les fusions impliquant les gènes ENL, ELL ou AF10 seraient de très mauvais pronostic⁴¹. Pour les duplications de MLL, l'impact pronostique reste discuté^{42,43}.
- CEBPA, dont le gène est localisé sur le chromosome 19, est un facteur de transcription majeur impliqué dans la granulopoïèse. On connaît actuellement trois types d'anomalies dans les LAM qui convergent toutes vers l'inactivation de ce facteur de transcription⁴⁴. La protéine de fusion AML1-ETO inhibe la transcription de CEBPA⁴⁵, la protéine de fusion PML-RARA empêche CEBPA de se fixer à l'ADN (Lodie *et al.*, abstract ASH 1999 non publié) et plus récemment ont été décrites des mutations ponctuelles de CEBPA⁴⁶. Ces mutations touchent soit le domaine N-terminal et aboutissent à la synthèse d'une protéine tronquée agissant comme un dominant négatif, soit la région C-terminale et altèrent le domaine bZIP permettant la fixation à l'ADN et l'hétérodimérisation. Dans 30 à 40% des cas, les altérations sont bialléliques.

Elles n'auraient pas d'impact sur l'obtention de la rémission complète, mais seraient de bon pronostic en terme de survie sans rechute et survie sans événement. On peut observer également que dans 90% des cas, les mutations de CEBPA sont mutuellement exclusives avec celles de FLT3 et N-Ras²⁵.

- Les mutations de NPM1, petite protéine navette nucléo-cytoplasmique codée sur le chromosome 5, ont été découvertes récemment dans les LAM. Initialement, les anomalies de NPM1 avaient été décrites dans les lymphomes anaplasiques où la t(2;5) fusionne NPM1 et ALK, ou plus exceptionnellement dans la LAP avec transcrite de fusion variant NPM-RARA. Les mutations détectées dans les LAM sont variées (environ 40) et sont toutes des insertions de quelques bases (4 dans >95% des cas) au niveau de l'exon 12. On les retrouve dans environ 50% des LAM à caryotype normal, si bien qu'elles représentent l'anomalie la plus fréquente dans ce sous-groupe cytogénétique. Elles sont de bon pronostic en terme de réponse au traitement d'induction, de survie sans événement et de survie globale, à condition de ne pas être associées à une duplication de FLT3, anomalie à laquelle elles sont pourtant souvent corrélées. Les mutations de NPM1 sont rarement associées aux mutations de CEBPA et aux duplications de MLL²⁵.
- WT1 (Wilm's Tumor gene) est une protéine à doigts de zinc codée en 11p13 agissant soit comme un oncogène, soit comme un suppresseur de tumeur. Son rôle exact dans l'hématopoïèse n'est pas très bien connu. Son inactivation favoriserait la prolifération cellulaire et induirait un blocage de différenciation^{47,48}. Les mutations de WT1 sont détectées dans 10 à 15% des LAM et seraient associées à une moins bonne réponse au traitement d'induction⁴⁹. L'impact pronostique de ces mutations est encore actuellement en cours d'évaluation.
- D'autres gènes mutés peuvent être rattachés à ce groupe de complémentation. Ainsi, on dénombre environ 10% de mutations du gène suppresseur de tumeur p53 dans les LAM *de novo*⁵⁰. Ces anomalies, le plus souvent des mutations ponctuelles ou des délétions, sont beaucoup plus fréquentes dans les LAM secondaires à un traitement par des agents alkylants, des sels de platine ou des inhibiteurs de topoisomérase II⁵¹. Elles sont fréquemment associées à une perte d'hétérozygotie et doivent être rapidement détectées car ceci se traduit par une très courte réponse à la chimiothérapie et doit faire envisager une allogreffe de moelle⁵². Des mutations de PU.1, facteur de transcription indispensable à la différenciation myélo-monocytaire, sont aussi détectées dans les LAM; elles sont rares indiquant leur faible implication dans la leucémogénèse^{53,54}.

Les connaissances sur la leucémogénèse ne cessent de progresser et la liste des gènes présentés ci-dessus est loin d'être exhaustive. Ces anomalies représentent l'essentiel de celles qui sont aujourd'hui utilisées en clinique car leur valeur pronostique a été clairement établie. On peut également mentionner les gènes EVI-1, BAALC, MN1 et ERG dont l'hyper-expression est associée à un mauvais pronostic mais dont l'évaluation sur de larges cohortes est encore en cours⁵⁵⁻⁵⁸. L'anomalie la plus récemment décrite mais dont la valeur est encore peu connue est celle du gène TET2, situé en 4q24 et codant une protéine dont les fonctions ne sont pas encore élucidées. Des mutations de TET2 (perte d'hétérozygotie et mutations ponctuelles) ont été retrouvées dans 20% des patients atteints de MDS, 12% des patients atteints de syndrome myéloprolifératif, 22% des patients atteints de LMMC, 24% des patients atteints de LAM secondaires⁵⁹ et 30% des mastocytoses⁶⁰. Il semble donc que ces mutations, qui font de TET2 un nouveau gène suppresseur de tumeur, soient un évènement fondateur commun à toutes ces pathologies myéloïdes. Dans les LAM, la présence de mutations de TET2 semble associée à un mauvais pronostic⁶¹.

La technologie à haut débit ne cessant de progresser et étant de plus en plus accessible, il est certain que les analyses de SNP, de CGH arrays et le séquençage du génome en entier^{62,63} identifieront de nouveaux gènes impliqués dans la leucémogénèse, qui deviendront tout autant de cibles à atteindre par les nouveaux traitements.

1.4. Traitement classique des LAM

L'objectif primaire du traitement des patients atteints de LAM est d'obtenir une rémission complète par un traitement d'induction et de prévenir la rechute de la leucémie par un traitement de consolidation. Les critères de rémission complète sont la présence de moins de 5% de blastes médullaires, un taux de polynucléaires neutrophiles sanguin supérieur à 1000/mm³ et un taux de plaquettes sanguin supérieur à 100 000/mm³. Une fois que le patient a atteint la rémission complète et le reste pendant 3 ans, le risque de rechute devient inférieur à 10%¹.

- Traitement d'induction :

Depuis 30 ans, le « gold standard » du traitement des LAM consiste à associer une anthracycline, telle que la daunorubicine ou l'idarubicine, à la cytarabine. Cette combinaison, classiquement appelée « 3+7 » car la daunorubicine est administrée pendant 3 jours et la cytarabine pendant 7 jours, permet d'obtenir une rémission complète chez environ 70% des patients âgés de 18 à 60 ans^{64,65 66}. Plusieurs essais ont été mis en place pour améliorer ce taux de réponse, en remplaçant la daunorubicine par l'idarubicine^{67,68}, en administrant la cytarabine à forte dose^{69,70}, en ajoutant du mitoxantrone^{71,72}, d'autres agents

cytotoxiques (etoposide, fludarabine, topotecan)⁷³⁻⁷⁷ ou des facteurs de croissance^{78,79}, mais tous ont globalement eu des effets minimes même si quelques uns ont prolongé la survie sans évènements dans certains sous-groupes. Les protocoles les plus récents semblent toutefois encourageants. L'augmentation de dose de la cytarabine a un peu amélioré le taux de RC mais s'est surtout heurté au problème majeur d'une plus grande toxicité et mortalité, particulièrement chez les bons répondeurs à la chimiothérapie standard (LAM avec t(8 ;21), inv(16) ou LAM à caryotype normal, NPM1 muté et FLT3 non dupliqué, ou à caryotype normal et CEBPA muté)⁸⁰. Pourtant, il est encore nécessaire d'améliorer ce traitement standard, notamment pour les patients ayant des anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic car plus de 50% d'entre eux ne répondent pas à ce traitement, ou pour les patients âgés qui n'ont pas bénéficié des progrès durant ces trente dernières années (**figure 7**).

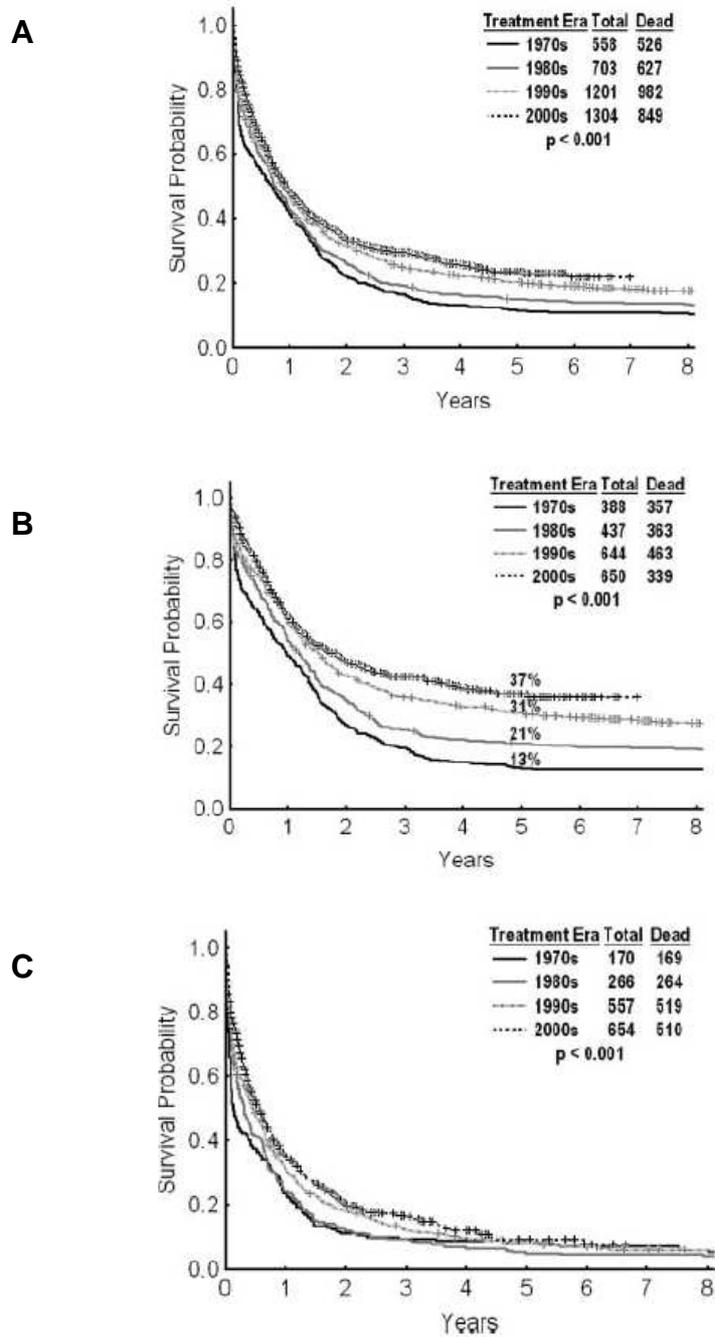


Figure 7 : taux de survie des patients atteints de LAM traités au M.D. Anderson Center de 1973 à nos jours (n=3766) en fonction de leur décennie de prise en charge. (A) Taux de survie de tous les patients. (B) Taux de survie chez les patients âgés de moins de 60 ans. (C) Taux de survie chez les patients âgés de plus de 60 ans (H. Kantarjian *et al.* Cancer 2008).

- Traitement de consolidation :

Une fois la rémission complète obtenue, il est essentiel de prévenir la survenue d'une rechute par une deuxième séquence de traitement intensif. Globalement, trois options s'offrent aux patients : l'allogreffe de moelle, l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques ou la chimiothérapie. Le choix de l'une de ces options dépend essentiellement de l'âge du patient, du type de LAM, des facteurs pronostiques biologiques et de l'existence d'un donneur HLA-compatible dans le cas de l'allogreffe de moelle.

L'allogreffe de moelle osseuse est pratiquée depuis environ 15 à 20 ans et permet de guérir environ 60% des receveurs. C'est le traitement anti-leucémique le plus efficace puisque le risque de rechute d'un patient greffé en 1^{ère} RC est inférieur à 20%. Cette efficacité tient d'une part au conditionnement pré-greffe associant de fortes doses de chimiothérapie à une irradiation corporelle totale, et d'autre part à l'effet du greffon contre la leucémie (GVL). Malheureusement, cette approche thérapeutique est toxique et associée à de lourdes complications du fait de la grande immunosuppression qu'elle engendre pouvant aboutir au décès du patient par infection ou par réaction du greffon contre l'hôte (GVH) alors même qu'il est en rémission complète. Du fait de cette grande toxicité, l'allogreffe est habituellement restreinte aux patients de moins de 55 ans et dont la LAM comporte des facteurs de mauvais pronostic⁶. Chez les patients de risque intermédiaire, l'allogreffe de moelle n'apporte pas de bénéfice comparée à un traitement de consolidation comportant de fortes doses de cytarabine⁸¹. Chez les patients à haut risque, les résultats de l'allogreffe de moelle après un conditionnement classique semblent encore loin d'être satisfaisants⁸² et ces patients devraient bénéficier de nouvelles approches thérapeutiques. Très récemment, l'institut du cancer Dana Farber à Boston a réalisé une méta-analyse reprenant les résultats de 24 essais cliniques concernant 6007 patients LAM ayant été allogreffés en 1^{ère} RC. Il a montré que la greffe de moelle osseuse allogénique, comparées aux autres greffes non-allogéniques, permet une augmentation significative de la survie globale et de la survie sans rechute des patients de mauvais pronostic et de risque intermédiaire sans modifier celles des patients de bon pronostic⁸³.

Pourtant, en l'absence de donneur géno ou phéno-identique, l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques doit être envisagée. Plusieurs études anciennes ont montré le bénéfice de l'autogreffe associée à une chimiothérapie intensive comparée à un traitement par chimiothérapie intensive en termes de survie sans rechute⁸⁴⁻⁸⁶. La survie globale est toutefois comparable dans les deux groupes, les patients rechutant dans le groupe chimiothérapie seule pouvant être rattrapés par l'autogreffe. A l'heure actuelle, l'autogreffe semble améliorer la survie sans maladie de manière modeste et son intérêt réside surtout dans la rapidité de reconstitution hématologique post-greffe et dans une moindre morbidité et mortalité attribuable au traitement. Il est clair que son intérêt varie aussi en fonction des différents groupes pronostiques⁸⁷. Enfin, la survenue de rechute post-autogreffe pose

encore un problème du fait de l'absence d'effet GVL et d'une contamination du greffon par la maladie résiduelle leucémique⁸⁸.

Le traitement de consolidation le plus courant demeure la chimiothérapie utilisant de fortes doses de cytarabine (3g/m^2), drogue pour laquelle il a été clairement mis en évidence un effet-dose, dans les limites toutefois de la toxicité. A ces doses, la molécule franchit la barrière hémato-encéphalique et permet la prévention des rechutes dans le système nerveux central. La cytarabine est en général associée à une anthracycline différente de la daunorubicine (idarubicine, mitoxantrone, rubidazone) ou à un autre agent intercalant comme l'amsacrine. Il est parfois rajouté un 3^{ème} produit comme l'étoposide. La chimiothérapie d'intensification permet d'obtenir un taux de RC d'environ 30 à 45% maintenue à 5 ans, voire même 60% chez les patients ayant des anomalies cytogénétiques favorables (t(8;21) et inv(16)). Cette phase du traitement pose toutefois un problème majeur pour le traitement des LAM des sujets âgés qui bien souvent cumulent des facteurs de mauvais pronostic avec une cytogénétique défavorable, des antécédents de myélodysplasie, un cœur défaillant ne pouvant pas supporter une chimiothérapie intensive. La médiane de survie des patients atteints de LAM et âgés de plus de 65 ans est de 9 à 12 mois. Cette population est en général plutôt orientée vers un traitement d'entretien et devrait également particulièrement bénéficier des nouvelles approches thérapeutiques.

- Traitement d'entretien :

Cette phase du traitement fait appel à des cures de chimiothérapie à faible dose (6-mercaptopurine ou 6-thioguanine per os plusieurs jours par semaine et cytarabine sous-cutanée ou méthotrexate intramusculaire une fois par semaine) avec des réinductions mensuelles. Les réinductions sont en général composées des mêmes produits mais à des doses plus faibles que celles utilisées lors de l'induction. En plus de ce type de traitement, la prophylaxie des atteintes du système nerveux central (SNC) est proposée, surtout pour les formes hyperleucocytaires au diagnostic, les LAM5 ou avec inv(16). Cette prophylaxie consiste en des injections intrathécales de cytarabine (40 mg) et de méthotrexate (15 mg) associées à la radiothérapie du SNC. Le traitement d'entretien ne semble pas augmenter la durée de RC chez les patients ayant reçu un traitement de consolidation intensif mais il est très utile chez les patients âgés non éligibles pour la chimiothérapie intensive et chez les patients ayant posé des problèmes toxiques ou infectieux lors de l'induction.

- Traitements de rattrapage et des rechutes :

Il est nécessaire d'aborder cette phase du traitement car globalement, seuls 30% des patients atteints de LAM auront une survie sans maladie prolongée (>5ans) et de nombreux patients n'atteignent pas la rémission complète après leur premier cycle de traitement.

En cas d'échec thérapeutique, une deuxième cure de chimiothérapie peut être administrée. Elle comportera soit les mêmes drogues que le traitement initial, soit le plus souvent des

drogues différentes. Cette deuxième cure prend également en compte le degré de l'échec (complet ou partiel), l'âge du patient, et peut varier selon les protocoles. En tout état de cause, elle augmente les risques cardiaques, hépatiques et cutanés, et prolonge l'aplasie ce qui aggrave les risques infectieux.

Les rechutes surviennent surtout dans les deux premières années (médiane autour de 13 mois). Leur traitement et leur pronostic dépendent de la durée de la rémission complète, de l'état physique du patient et surtout du traitement initial, notamment s'il a comporté une allogreffe de moelle osseuse. Le pronostic des rechutes après chimiothérapie ou autogreffe survenant moins d'un an post-rémission complète est catastrophique et justifie le recours à des thérapeutiques innovantes protocolaires. Le traitement comporte en général de fortes doses de cytarabine (1 à 3g/m²) associées à une anthracycline ou un agent intercalant et parfois de l'étoposide. Une deuxième RC peut être obtenue dans 30 à 50% des cas selon les facteurs pronostiques initiaux et selon la durée de la 1^{ère} RC. Le traitement de consolidation fait appel ensuite à l'option thérapeutique qui n'a pas été utilisée : chimiothérapie si autogreffe et autogreffe si chimiothérapie. Quoi qu'il en soit, si la durée de 1^{ère} RC est inférieure à 1 an, l'allogreffe de moelle osseuse doit être envisagée en 2^{ème} RC. En l'absence de donneur dans la fratrie, et si le patient est jeune, l'allogreffe avec un donneur non apparentée peut être proposée. Au delà de 50 ans, les risques de mortalité par toxicité ou GVH sont trop importants.

Dans le cas de l'allogreffe de moelle osseuse en 1^{ère} RC, les rechutes tardives à plus d'un an peuvent bénéficier d'une chimiothérapie pour obtenir une deuxième RC. Dans cette situation, les chimiothérapies sont particulièrement toxiques, provoquent une longue aplasie et augmentent le risque infectieux. Une seconde allogreffe est ensuite possible si l'état du patient le permet. La diminution de la prophylaxie contre la GVH peut être diminuée, si cette dernière était absente lors de la première greffe, de manière à augmenter l'effet GVL. La survie sans rechute reste toutefois faible. Si la rechute survient dans la 1^{ère} année post-greffe, une nouvelle chimiothérapie ou une nouvelle greffe ne sont pas raisonnables en raison de la toxicité. En fonction du chimérisme lymphocytaire et médullaire, et de la présence ou non d'une GVH, des injections de lymphocytes du donneur peuvent être réalisées pour essayer de restaurer un effet GVL. Par cette technique, des deuxièmes rémissions durables ont été obtenues, parfois au prix d'une forte GVH et d'une aplasie initiale⁸⁹.

- Nouvelles drogues :

Parmi les drogues actuellement testées, de grands espoirs sont fondés dans la clofarabine. Cet analogue nucléosidique de l'adénosine a été approuvé dans le traitement des LAL pédiatriques réfractaires ou en rechute et fait actuellement l'objet d'essais cliniques dans les LAM. Plusieurs études ont été réalisées chez les sujets âgés et toutes montrent l'efficacité de la clofarabine en association à de faibles doses de cytarabine⁹⁰, et même en monothérapie

(A. Burnett, abstract n°869, congrès ASH 2007). Le groupe français de traitement des LAM (groupe ALFA) procède actuellement à un essai randomisé multicentrique de phase II comparant un traitement de consolidation utilisant l'association clofarabine plus cytarabine à faible dose (CLARA) *versus* cytarabine à forte dose chez les patients LAM de 18 à 60 ans de pronostic intermédiaire et mauvais. L'objectif de cet essai est d'observer une amélioration de la survie sans maladie à 2 ans.

Le tipifarnib est un inhibiteur de farnésyl-transférase et cible donc l'activation de la voie Ras. Lors d'une première étude chez des patient réfractaires ou en rechute, les résultats ont été décevants, le taux de rémission atteignant à peine 7%⁹¹. Une autre étude a rapporté 14% de rémissions complètes chez des patients âgés à haut risque et non éligibles pour la chimiothérapie intensive⁹². D'autres essais sont actuellement en cours pour tester cette molécule en association avec d'autres drogues, ou seule en traitement d'entretien²⁹.

Plusieurs inhibiteurs de FLT3 font l'objet d'essais cliniques, avec pour l'instant des résultats modestes. Le PKC-412 et le CEP-701 ont la particularité d'inhiber d'autres récepteurs à tyrosine kinase (PDGF-R, kit, FMS...). Ces deux molécules se sont montrées très efficaces *in vitro* mais n'ont eu que très peu d'effets lors d'essais cliniques en monothérapie^{93,94}. Ils sont désormais testés en association avec une chimiothérapie standard et les résultats semblent prometteurs⁹⁵. Un nouvel inhibiteur de FLT3, le MLN-518, donne également des résultats encourageants⁹⁶.

Le ciblage du récepteur c-kit semble également être une approche thérapeutique intéressante, surtout dans les LAM à CBF où les mutations de ce récepteur sont fréquentes. Le PKC-412 cité précédemment cible ce récepteur, mais également le dasatinib. L'utilisation de cette dernière molécule présente l'avantage d'être bien maîtrisée car elle est déjà largement utilisée en monothérapie dans la leucémie myéloïde chronique ou en association à la chimiothérapie dans les LA à chromosome Philadelphie. Elle fait actuellement l'objet d'essais cliniques dans les LAM à CBF en rechute (protocole dasa-CBF du groupe ALFA).

L'immunophénotypage systématique des blastes leucémiques a permis d'identifier le marqueur CD33 comme un bon candidat pour un traitement ciblé dans la mesure où il est exprimé par quasiment tous les blastes myéloïdes (>90%) et restreint aux tissus hématopoïétiques. Depuis 2001, un anticorps humanisé (gemtuzumab ozogamycine, GO) ciblant le CD33 et couplé à un puissant agent intercalant, la calichéamicine, a fait preuve de son efficacité dans les LAM. Il se heurte néanmoins à un problème de toxicité et des essais sont toujours en cours pour améliorer son schéma d'administration de manière à réduire au maximum les effets secondaires tout en conservant son efficacité anti-leucémique. Cet anticorps est particulièrement intéressant dans la mesure où il serait également capable de cibler les cellules souches leucémiques (CSL).

Une des grandes attentes des avancées thérapeutiques réside dans l'éradication des CSL qui seraient responsables des rechutes car non atteintes par les traitements classiques. Depuis quelques années, la biologie des CSL est mieux connue et a permis de dégager quelques cibles thérapeutiques. Ainsi, les greffes de souris NOD/SCID ont montré que les CSL seraient CD34+/CD38-/CD33+ et exprimeraient aussi le CD123 (chaîne alpha du récepteur de l'IL-3)⁹⁷. Elles pourraient donc être atteintes par le GO ou par de l'IL-3 couplée à la toxine diphtérique (DR383 IL-3, en essai de phase I)⁹⁸. Des anticorps monoclonaux dirigés contre le CD44, récepteur de l'acide hyaluronique fortement exprimé sur tous les blastes de LAM, seraient capable d'induire la différenciation terminale des blastes pour tous les sous-types de LAM et même d'éradiquer les cellules souches leucémiques^{99,100}. Actuellement, ces anticorps ne sont utilisés que dans des essais pré-cliniques. D'autres équipes ont rapporté une activation des voies NFκB et mTOR dans les CSL, qui sont toutes autant de cibles dont les inhibiteurs sont déjà disponibles et en essais clinique ou pré-clinique.

Le traitement des LAM repose donc classiquement sur des combinaisons de chimiothérapies et, depuis quelques années, fait appel aux anticorps monoclonaux ou à des molécules ciblant les blastes leucémiques de manière spécifique. Malgré cette amélioration des traitements, le pronostic des LAM reste médiocre avec une survie globale à 5 ans pour seulement 30% des patients. Paradoxalement, les principales approches thérapeutiques des LAM qui viennent d'être décrites ont toutes pour objectif de réduire la « masse » leucémique » en déclenchant l'apoptose massive des blastes et idéalement celle des CSL. Elles ciblent donc toutes l'excès de prolifération des cellules leucémiques. Nous avons pourtant vu dans le modèle de Gilliland que la leucémogénèse nécessite deux évènements, l'un favorisant la prolifération et l'autre s'opposant à la différenciation. Ce deuxième évènement est rarement la cible des traitements antileucémiques. Pourtant, c'est bien en provoquant la disparition du transcrite PML-RARA que l'ATRA et l'As2O3 permettent l'obtention d'une rémission complète dans les LAP. Ces drogues sont à ce jour les seules capables d'induire la différenciation des blastes leucémiques et surtout d'éradiquer les cellules souches leucémiques¹⁰¹. Elles ont révolutionné le traitement des LAP permettant d'obtenir une RC durable chez plus de 80% des patients. Aucun autre sous-type de LAM ne bénéficie d'un tel traitement. Nous allons maintenant nous intéresser à la différenciation myélo-monocytaire normale et leucémique ainsi qu'aux différentes drogues qui peuvent modifier avec plus ou moins d'efficacité ces processus.

2. Le rétablissement de la différenciation myélo-monocytaire pour traiter les LAM

2.1. Acteurs physiologiques de la différenciation myélo-monocytaire

Toutes les cellules hématopoïétiques dérivent de la cellule souche hématopoïétique qui donne naissance à des progéniteurs qui s'engagent dans un lignage spécifique et dont la différenciation produit les cellules matures fonctionnelles : érythrocytes, plaquettes et leucocytes. Les granulocytes et les monocytes matures ont pour origine un progéniteur granulo-monocytaire commun (GMP). Ce progéniteur est à l'origine des CFU-G (granulocyte-colony forming unit), des CFU-M (monocyte-colony forming unit) et des CFU-GM (granulocyte/monocyte-colony forming unit). Les cultures de progéniteurs *in vitro* en milieu semi-solide (méthylcellulose) ont montré que le facteur de croissance G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) permet la formation des CFU-G, le M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) permet la formation des CFU-M et l'association d'IL-3 et de GM-CSF permet la formation des CFU-G, CFU-M et CFU-GM. Cette origine commune étroite entre les granulocytes et les monocytes est renforcée par l'observation de LAM à composante myéloïde et monocytaire (sous-type M4 de la classification FAB)¹⁰². Il faut noter toutefois que la plasticité des cellules souches va bien au-delà de cette origine commune myélo-monocytaire puisque des progéniteurs communs lymphoïde B/macrophages ont été mis en évidence dans le foie fœtal et la moelle osseuse. Dans le même ordre d'idée, les précurseurs monocytaires peuvent se différencier en macrophages, mais aussi en ostéoclastes, et les cellules dendritiques peuvent avoir pour origine soit le GMP, soit le progéniteur lymphoïde commun (CLP). Les relations entre tous les lignages hématopoïétiques sont donc étroites et la régulation de la différenciation nécessite des mécanismes complexes que nous allons voir plus en détails.

La différenciation des myéloblastes (précurseurs granuleux immatures) en polynucléaires neutrophiles est ordonnée en plusieurs étapes cytologiquement identifiables : les promyélocytes sont de grandes cellules au cytoplasme basophile où des granules primaires commencent à apparaître. Ils se différencient en myélocytes dans lesquels on commence à distinguer des granules secondaires. Les cellules arrêtent de se diviser à ce stade. Elles donneront ensuite des métamyélocytes, dont le cytoplasme a perdu toute basophilie et le noyau est arqué, puis des polynucléaires neutrophiles, contenant des granules tertiaires et caractérisés par leur noyau polylobé. Les marqueurs précoces de la granulopoïèse sont les antigènes de surface CD13 et CD33 ainsi que le récepteur au G-CSF. Les neutrophiles matures expriment le marqueur de surface Gr-1. Les granules primaires contiennent de la

myéloperoxydase, de l'élastase, de la protéinase 3 et du lysozyme. Les granules secondaires sont constitués de lactoferrine et de gélatinase.

La monopoïèse consiste en la différenciation des monoblastes en monocytes circulants, qui eux-mêmes pourront se différencier en macrophages tissulaires. Les marqueurs précoces de ce lignage sont le récepteur au M-CSF, le lysozyme et le récepteur Fcγ(II/III). Sur les cellules matures, on retrouve plusieurs marqueurs de surface tels que le CD14, le CD11b, le CD18 et le récepteur scavenger. Il faut remarquer que le CD11b et le CD18 sont présents également sur les polynucléaires neutrophiles, et que le récepteur Fcγ est exprimé aussi sur les progéniteurs myéloïdes.

L'engagement de la cellule souche hématopoïétique vers l'un ou l'autre de ces deux lignages est un processus complexe où interviennent plusieurs cytokines, de nombreux facteurs de transcription et qui nécessite l'activation de différentes voies de signalisation (**figure 8**).

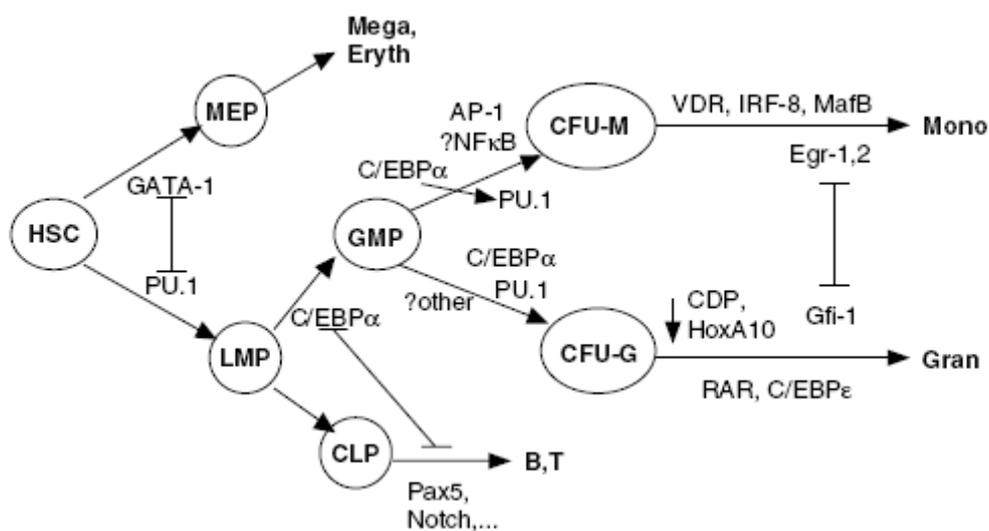


Figure 8 : Modèle de régulation transcriptionnelle de l'engagement et de la différenciation granuleuse et monocyttaire (A.D. Friedman, Oncogene 2007).

La première étape de la différenciation myélo-monocytaire commence par l'orientation de la CSH vers le progéniteur commun myéloïde/lymphoïde (LMP) au détriment du progéniteur commun érythro-mégacaryocytaire (MEP). Ce choix est dicté par le facteur de transcription PU-1 alors que l'orientation vers le MEP est guidé par le facteur de transcription GATA-1. Les LMP expriment donc PU-1 à un plus haut niveau que les MEP. Il existe une inhibition croisée

entre PU-1 et GATA-1 pour maintenir l'équilibre entre ces deux branches de différenciation^{103,104}.

PU-1 se lie à l'ADN de façon monomérique via un domaine Ets en C-terminal et active la transcription par sa région N-terminale riche en glutamine¹⁰⁵. Son rôle dans cette première étape de différenciation a été clairement démontré par un modèle de souris knock-out (ko) qui n'ont pas de lymphocytes B ni de monocytes et ont un nombre très réduit de granulocytes¹⁰⁶. Leur nombre de LMP et de GMP est très diminué tandis que les MEP sont augmentés¹⁰⁷. La surexpression des récepteurs au G-CSF et au M-CSF dans les cellules de moelle des souris PU-1^{-/-} ne rétablit pas leur myélopoïèse, ce qui indique que le facteur de transcription PU-1 est requis bien avant l'induction de ces récepteurs^{108,109}. PU-1 intervient également dans la balance granulocytes/monocytes puisque sa réexpression à un faible niveau dans les cellules PU-1^{-/-} induit la granulopoïèse alors qu'à un haut niveau d'expression de PU-1, c'est la monopoïèse qui est favorisée^{110,111}. De plus, la délétion d'un enhancer distal de PU-1 (localisé à -14kb) diminue de 20% l'expression de PU-1 et entraîne la perte de la monopoïèse alors que la granulopoïèse est conservée¹¹². Ces effets pourraient être la conséquence d'une régulation de la sensibilité des récepteurs au G-CSF et au M-CSF par PU-1.

L'engagement du LMP vers le GMP requière un fort niveau d'expression de PU-1 et surtout sa coopération avec le facteur de transcription C/EBP α . A cette étape de la différenciation, il existe une inhibition croisée entre C/EBP α et les facteurs de transcription lymphoïdes NOTCH et PAX5 de manière à maintenir l'équilibre entre ces deux voies.

La famille C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) comprend plusieurs facteurs de transcription, C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ et C/EBP ϵ qui sont tous exprimés dans les cellules myéloïdes et peuvent avoir une activité redondante quand l'un d'eux est déficient. Les CEBPs s'homo ou s'hétéro-dimérisent *via* leur domaine leucine-zipper en C-terminal et se fixent à l'ADN, toujours sous forme de dimères, par une région basique adjacente¹¹³. C/EBP α est majoritairement exprimé dans les cellules immatures CSH, LMP et GMP mais n'est pas détecté dans les MEP ni dans les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP)^{114,115}. C/EBP ϵ est retrouvé dans les stades plus tardifs de la granulopoïèse¹¹⁶. Les souris C/EBP α ^{-/-} n'ont ni neutrophiles, ni éosinophiles alors qu'elles conservent des érythrocytes, des lymphocytes et des myéloblastes. Elles ont des monocytes circulants mais leur nombre est réduit dans le foie fœtal et dans la moelle, de même que le nombre de CFU-M alors même que les cellules expriment le récepteur au M-CSF¹¹⁷. Le ko conditionnel de C/EBP α chez des souris adultes induit un blocage juste avant le stade GMP¹¹⁸. Ce défaut de myélopoïèse serait dû à une expression réduite des récepteurs au G-CSF et au M-CSF qui possèdent chacun un site de fixation pour C/EBP α au niveau de leur promoteur^{119,120}. C/EBP α se lie également au promoteur de PU-1 et l'interaction de ces deux facteurs de transcription est capable de reprogrammer des cellules à orientation lymphoïde vers le lignage monocyttaire¹²¹. De plus,

la greffe de souris avec des moelles transduites par C/EBP α favorise la monoïèse et inhibe l'érythroïèse¹²². Il semblerait donc qu'au stade GMP, une forte expression de C/EBP α associée à une forte expression de PU-1 favorise la monoïèse plus que la granulopoïèse. En outre, C/EBP α est capable d'inhiber la transition G1/S du cycle cellulaire dans de nombreux lignages incluant le lignage myéloïde par divers mécanismes : liaison à E2F1 ou au CDK (cycline-dépendante kinases) 2 et 4 ou induction de p21¹²³⁻¹²⁵. Pour ce qui est des autres facteurs C/EBP, les souris C/EBP β -/- conservent tous les lignages hématopoïétiques¹²⁶. In vitro, les progéniteurs C/EBP β -/- produisent 25 à 50% moins de colonies myéloïdes par comparaison aux progéniteurs C/EBP β +/- quelles que soient les conditions cytokiniques et les colonies sont plus petites^{127,128}. Contrairement à C/EBP α , C/EBP β est donc capable de stimuler la prolifération des cellules myéloïdes. Les défauts d'hématopoïèse sont mineurs chez les souris C/EBP δ -/¹²⁹. Le taux de granulocytes est normal chez les souris C/EBP ϵ -/- mais les cellules ne possèdent pas de granules secondaires ce qui indique un défaut de maturation terminale^{130,131}.

Au stade GMP, les voies AP-1 et NF- κ B et les protéines IRF interagissent directement avec C/EBP α ou PU-1 pour augmenter leur niveau d'expression et vont influencer l'orientation vers le lignage granuleux ou monocytaire.

La famille AP-1 est constituée de nombreux facteurs de transcription à domaine leucine zipper qui, comme les C/EBP, forment des homo et des hétérodimères avant de se lier à l'ADN. Ainsi, les protéines Jun (JunB, c-Jun et JunD) peuvent s'hétérodimériser avec les protéines c-Fos, FosB, Fra1 ou Fra2^{132,133}. Cette interaction requiert la phosphorylation des protéines Jun par des Jnkineses (JNK). Une redondance existe entre toutes ces protéines si bien que les souris c-Jun-/- et JunB-/- possèdent tous les lignages hématopoïétiques¹³⁴. En revanche, les souris déficientes pour JunB uniquement dans les cellules hématopoïétiques ont un nombre de granuleux augmenté qui serait dû à la perte de l'effet anti-prolifératif de JunB sur le lignage granuleux plus qu'à son effet sur l'engagement du GMP¹³⁵. L'apport exogène de c-Fos ou de c-Jun dans des cellules myéloïdes induit leur différenciation monocytaire. L'ajout d'un inhibiteur chimique des JNK, le SP600125, à la culture de progéniteurs de moelle de souris en présence de M-CSF réduit leur différenciation en macrophages¹³⁶. Les protéines kinases C (PKC) favoriseraient la différenciation monocytaire en activant les JNK soit par leur phosphorylation directe soit par l'activation des MEKK, kinases des JNK¹³⁷. Enfin, même en l'absence d'un autre membre AP-1 en *Cis*, c-Jun interagirait directement avec PU-1 et augmenterait sa capacité à activer le promoteur du récepteur au M-CSF^{138,139}.

La famille NF- κ B comprend cinq membres, c-Rel, RelA ou p65, RelB, NF- κ B1 ou p50 et NF- κ B2 ou p52. Chacun d'entre eux possède un domaine Rel permettant leur dimérisation et leur liaison à l'ADN. L'hétérodimère p50-p65 prédomine dans la plupart des types cellulaires tandis que p52 pallie au défaut de p50 et c-Rel peut se substituer à p65¹⁴⁰. NF- κ B et C/EBP β

coopèrent pour se lier aux promoteurs de l'IL-6, l'IL-8 et du G-CSF¹⁴¹. C/EBP α et NF- κ B interagissent directement pour induire l'expression de plusieurs gènes nécessaires au développement monocyttaire dans les cellules myéloïdes immatures. Aucun déficit myéloïde n'a été observé chez les souris p50 $^{-/-}$ probablement du fait de la compensation par les autres membres de la famille NF- κ B¹⁴². Dans les cellules myéloïdes plus matures, l'interaction de la région N-terminale de C/EBP ϵ avec NF- κ B permet l'activation du programme transcriptionnel associé à la différenciation terminale¹⁴³.

La phosphorylation du domaine PEST de PU-1 permet son interaction avec les protéines IRF4 et 8 (interferon regulatory factor)^{144,145}. La phosphorylation des tyrosines d'IRF8 prévient son interaction directe avec l'ADN et force donc son association soit avec d'autres IRF soit avec PU-1 avant toute liaison à l'ADN¹⁴⁶. La tyrosine phosphatase SHP-2, dont l'activité diminue au cours de la différenciation myéloïde, augmente l'activité d'IRF8 et facilite ses interactions avec PU-1¹⁴⁷. Les souris IRF8 $^{-/-}$ ont un nombre réduit de macrophages et un nombre augmenté de granulocytes. Leurs progéniteurs hématopoïétiques produisent toujours plus de CFU-G au détriment des CFU-M, qu'ils soient cultivés en G-CSF, en M-CSF ou GM-CSF. La réexpression d'IRF8 dans la moelle de ces souris restaure la monopoïèse aux dépens de la granulopoïèse par le rétablissement des interactions de PU-1 avec l'ADN^{148,149}. Comme il a déjà été décrit que des niveaux élevés de PU-1 sont nécessaires à la monopoïèse, cette dernière observation suggère qu'une grande quantité de PU-1 facilite probablement les interactions PU-1/IRF8 qui vont réguler les gènes de l'engagement monocyttaire. On ne sait pas actuellement si l'engagement granuleux a lieu uniquement quand le niveau de PU-1 est trop faible ou s'il existe des régulateurs positifs de cette voie qui seraient up-régulés par les signaux transduits par le récepteur du G-CSF. Des études anciennes avaient suggéré le rôle de STAT3 dans l'engagement vers la granulopoïèse¹⁵⁰. Plus récemment, le rôle des protéines régulatrices Id1 dans cette voie a été exploré¹⁵¹.

Les différents acteurs décrits jusqu'à lors vont orienter l'engagement du GMP vers le lignage granuleux ou monocyttaire. Une fois que cette orientation est amorcée, d'autres facteurs de transcription et voies de signalisation vont intervenir pour finaliser la différenciation terminale.

Les facteurs de transcription à domaine leucine zipper MafB et c-Maf sont exprimés exclusivement dans les monocytes et les macrophages¹⁵². MafB peut interagir avec c-Fos alors que c-Maf peut se lier à c-Jun, JunB ou c-Fos et tout ces hétérodimères peuvent se fixer au site consensus AP-1¹⁵³. La surexpression de MafB ou de c-Maf dans des lignées myéloïdes provoque leur différenciation monocyttaire tandis que la down-régulation de MafB est indispensable à la maturation des cellules dendritiques^{154,155}. Les cellules de foie fœtal mafB $^{-/-}$ produisent un nombre normal de CFU mais ces cellules sont incapables de maturer en macrophages. Ainsi, MafB et probablement les complexes MafB/c-Fos jouent un rôle dans la

différenciation terminale alors qu'ils n'interviennent pas dans le développement précoce du lignage monocytaire^{156,157}.

HOXA10 est un facteur de transcription exprimé préférentiellement dans les cellules myéloïdes immatures. La tyrosine phosphatase SHP2 agit directement sur HOXA10 permettant sa liaison à l'ADN et la répression des promoteurs de gp91-phox et p67-phox (composants de la chaîne oxydative exprimés pendant la différenciation granuleuse à partir du stade myélocytaire)^{158,159}. L'apport exogène d'HOXA10 stimule la monopoïèse et bloque la différenciation granuleuse terminale^{160,161}. La protéine CDP (CAAT displacement protein) inhibe la transcription par compétition avec les transactivateurs. La diminution de sa liaison à l'ADN au cours de la différenciation granuleuse terminale et sa capacité à réprimer le promoteur de gp91-phox suggèrent que la down-régulation de CDP est nécessaire à la différenciation neutrophile^{162,163}. De plus, les souris transgéniques pour CDP développent un syndrome myéloprolifératif avec infiltration de la moelle et de la rate par un excès de neutrophiles¹⁶⁴. Ainsi, la perte des activités inhibitrices d'HOXA10 et de CDP semble indispensable à la différenciation granuleuse.

Le facteur de transcription Gfi-1 est exprimé dans les lignages lymphoïdes et granuleux mais pas dans le lignage monocytaire¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. Il se fixe à l'ADN via un domaine en doigts de zinc C-terminal et réprime la transcription grâce à un domaine N-terminal Snail/Gfi-1 (SNAG)¹⁶⁸. Les souris Gfi-1/- ont un défaut de maturation neutrophile au-delà du stade promyélocyte où les cellules anormales contiennent des granules primaires sans granules secondaires ni tertiaires et expriment des gènes normalement restreints au lignage monocytaire^{166,169}. Ces observations sont en accord avec la répression par Gfi-1 d'un gène inducteur de la monopoïèse tel que PU-1, qui lui-même doit normalement activer un inhibiteur de la granulopoïèse terminale. En effet, la forte expression de PU-1 active alors les gènes Egr et Nab-2¹¹¹. Egr-1 et Egr-2 sont des facteurs de transcription en doigts de zinc qui peuvent soit activer soit inhiber l'expression de gènes¹⁷⁰. Egr-1 provoque la différenciation en monocytes des lignées myéloïdes et celle des progéniteurs de moelle de souris au détriment du lignage granuleux^{171,172}. Pourtant, les souris Egr-1/- et les progéniteurs de foie fœtal Egr-2/- produisent un nombre normal de macrophages. Seule l'expression d'un dominant négatif d'Egr dans les cellules de moelle ou l'analyse de cellules Egr-1/- et Egr-2+/- aboutit à un défaut de maturation monocytaire, et uniquement lorsque ces cellules sont cultivées en présence de M-CSF, indiquant une possible redondance entre ces deux facteurs^{111,173}. Le complexe Egr/Nab2 inhibe la granulopoïèse en réprimant le promoteur de Gfi-1 tandis que Gfi-1 réprime directement le promoteur d'Egr-2 et inhibe sa transactivation par PU-1, reflet de l'inhibition croisée de ces deux systèmes.

Enfin, les récepteurs nucléaires sont également largement impliqués dans la différenciation terminale granuleuse et monocytaire. Les récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR α et RAR γ) se lient à l'ADN par leur domaine en doigts de zinc et peuvent former des hétérodimères avec

les protéines RXR¹⁷⁴. Les RARs sont exprimés de manière ubiquitaires mais RAR α est préférentiellement retrouvé dans les cellules myéloïdes où il régule le promoteur de C/EBP ϵ ^{175,176}. Le dominant négatif de RAR α provoque un arrêt de la granulopoïèse au stade promyélocyte et les neutrophiles RAR α -/- et RAR γ -/- ne peuvent pas se différencier au-delà du stade myélocytaire¹⁷⁷. Les RAR activent aussi le promoteur de CD18 et provoquent l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules myéloïdes en différenciation¹⁷⁸. L'acide rétinoïque induit la différenciation des progéniteurs de moelle majoritairement en CFU-G tandis que la vitamine D3 (1 α ,25-OH₂-VD3), qui provoque la formation de complexe entre VDR (Vitamin D receptor) et RXR, induit la formation majoritaire de CFU-M au détriment des CFU-G^{179,180}. Ajoutés ensemble, l'acide rétinoïque et la vitamine D3 (VD3) favorisent le développement monocytaire car d'une part, les complexes VDR/RXR répriment les sites où se fixent les complexes RAR/RXR (RAR/RXR responsive element) et inhibent donc la granulopoïèse, et d'autres part, ils induisent la monopoïèse en se fixant sur des sites dédiés où les RAR n'interagissent pas¹⁸¹. Les interactions de ce système de différenciation avec celui des facteurs de transcription ne sont pas totalement élucidées, de même que leur régulation.

Les modifications épigénétiques telles que la méthylation des îlots CpG et la désacétylation des histones sont responsables de l'extinction de l'expression des gènes et peuvent jouer un rôle important dans la progression des tumeurs en down-régulant l'expression de gènes suppresseurs de tumeur ou de facteurs de transcription gouvernant la différenciation¹⁸². Depuis les années 1980, les agents déméthylants telles que la 5'-aza-cytidine et la 5'-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) ont montré leur capacité à induire la différenciation de cellules embryonnaires murines en cellules musculaires par inhibition de la méthylation de l'ADN. Ces drogues s'intègrent dans l'ADN où elles capturent les ADN méthyltransférases qui ne peuvent donc plus méthyler l'ADN. Plusieurs divisions cellulaires sont donc nécessaires avant que l'hyperméthylation d'un ADN tumoral soit transformé en ADN non méthylé. Le rôle des méthyltransférases dans l'inactivation du gène suppresseur de tumeurs p15 a notamment été montré dans la progression et le mauvais pronostic dans la LAP¹⁸³ puis dans les syndromes myelodysplasiques où la decitabine apparaît être un traitement efficace¹⁸⁴. Des études du méthylome ont depuis confirmé le rôle de ces modifications dans l'oncogénèse des LAM et leur impact pronostique¹⁸⁵. Plusieurs essais cliniques récents ont montré l'efficacité de la 5'-aza-cytidine dans le traitement des syndromes myélodysplasiques en progression et des LAM¹⁸⁶.

On connaît actuellement 4 classes d'histone déacétylases (HDAC) qui ont chacune des fonctions spécifiques et des inhibiteurs (HDACi) sont disponibles pour chaque classe. Les HDACi sont en général faiblement toxiques et ont l'avantage d'être administrables par voie orale. L'acide suberoylanilide hydroxamique (SAHA ou vorinostat) a été découvert en recherchant des composés ayant les mêmes propriétés différenciantes que le diméthylsulfoxyde (DMSO). Ses effets antitumoraux ont d'abord été démontrés dans de nombreuses lignées cellulaires et dans plusieurs modèles in vivo de tumeurs solides et de

leucémies. Les essais de phase I ont confirmé son efficacité dans de nombreuses hémopathies malignes¹⁸⁷ et récemment, le vorinostat a été utilisé avec succès dans le traitement de lymphomes T cutanés réfractaires¹⁸⁸. L'acide valproïque est un agent anti-convulsivant connu depuis longtemps dont on a découvert les propriétés d'HDACi assez récemment. Il agit *in vitro* en synergie avec l'ATRA pour induire la différenciation de lignées myéloïdes¹⁸⁹. Une étude pilote associant les deux composés chez 8 patients ayant une LAM de haut risque ou réfractaire a montré un bénéfice clinique chez 7 des patients. La différenciation myélomonocytaire des blastes circulants a été associée à l'hyperacétylation des histones¹⁹⁰. Plus récemment, une étude de phase I utilisant un HDACi oral isotype-spécifique chez 29 patients atteints de LAM ou de MDS a permis l'obtention d'une rémission complète chez trois d'entre eux. Tous avaient reçu au moins une ligne de traitement par chimiothérapie avant d'être inclus dans cet essai très prometteur¹⁹¹.

La levée du blocage de différenciation est une approche thérapeutique séduisante dans les LAM qui conduirait les blastes à s'engager soit vers la différenciation granuleuse, soit vers la différenciation monocytaire pour aboutir au stade terminal d'apoptose. Les agents déméthylants et les HDACi induisent l'allumage global de tous les gènes sans spécification de lignage. Leur utilisation ne peut donc être envisagée qu'en association avec des « inducteurs de différenciation lignage spécifique ». Sur le versant granuleux, l'ATRA a depuis longtemps fait ses preuves dans le traitement des LAP. Sur le versant monocytaire, les propriétés différenciantes de la vitamine D ont été démontrées mais n'ont toujours pas été complètement exploitées. Nous allons maintenant nous intéresser à ces deux approches thérapeutiques différenciantes lignage spécifique.

2.2. Blocage de la différenciation granuleuse et rétablissement par traitement différenciant : le cas de la LAP

La leucémie aigüe promyélocytaire (LAP) correspond au sous-type M3 dans la classification FAB. Elle se caractérise par un blocage de la maturation granuleuse au stade promyélocytaire et la présence de la translocation t(15 ;17) associée au transcrite de fusion PML-RARA. Il existe des transcrits de fusion variants résultant de la t(11 ;17) et de la t(5 ;17) qui sont détectés dans moins de 2% des patient LAP. Historiquement, la LAP a été décrite en 1957 chez 3 patients par Hillestad, un médecin suédois, comme étant la forme de LAM la plus agressive associant un envahissement sanguin par des promyélocytes et une prédisposition aux saignements sévères¹⁹². Ces hémorragies ont été attribuées par Bernard en 1959 à une coagulation intravasculaire disséminée et à une hyperfibrinolyse¹⁹³.

Jusque dans les années 1970, les seuls traitements antileucémiques reposent sur la chimiothérapie dont le but est de réduire la prolifération des cellules malignes. La LAP est

relativement assez sensible à la chimiothérapie puisque la daunorubicine seule permet d'obtenir une RC chez 55% des patients et son association à la cytarabine augmente le taux de RC à 80%¹⁹⁴. Ce traitement présente toutefois l'inconvénient d'aggraver le syndrome hémorragique et nécessite le recours aux transfusions de plaquettes et perfusions de fibrinogène. En outre, la durée médiane de rémission complète reste courte (11 à 25 mois) et si on se base sur les critères de survie sans maladie à 5 ans, seuls 35 à 45% des patients sont guéris par la chimiothérapie¹⁹⁵.

Une avancée majeure a lieu en 1978 lorsque Sachs annonce que certains agents chimiques peuvent induire la différenciation des cellules leucémiques¹⁹⁶. En 1980, Breitman démontre que le butyrate, le DMSO et l'acide rétinoïque sont capables d'induire la différenciation de la lignée leucémique HL60 dont la morphologie est proche du promyélocyte. Il décrit également l'efficacité de l'acide rétinoïque pour faire différencier les blastes humains de LAP^{197,198}. La preuve de l'efficacité clinique de l'acide rétinoïque est apportée par deux équipes qui utilisent son isomère 13-cis (qui ne diffère de l'ATRA que par l'orientation du résidu COOH terminal). L'administration de ce composé aux patients améliore leur état clinique voire induit leur rémission complète et induit la différenciation des promyélocytes^{199,200}. Des équipes de recherche en Chine disposent de l'ATRA et démontrent la supériorité de son efficacité *in vitro* et *in vivo* sur l'isomère 13-cis²⁰¹. L'idée d'un traitement différenciant associant ATRA et chimiothérapie naît de leur rencontre avec L. Degos à l'hôpital Saint Louis, à Paris, où l'on a démontré les propriétés différenciantes de la cytarabine à petites doses. Ainsi, en 1985, une jeune patiente chinoise de 5 ans atteinte de LAP est la première à bénéficier de ce traitement. Le traitement d'induction n'est constitué que d'ATRA et induit la RC en seulement 3 semaines. Le traitement de consolidation alterne les cures d'ATRA et de cytarabine pendant 1 an. Cette patiente est actuellement toujours en rémission complète et en bonne santé²⁰². Le succès de ce cas pilote a bien évidemment encouragé la mise en place d'essais cliniques qui ont tous confirmé l'efficacité de l'ATRA dans le traitement des LAP. L'étude du groupe européen APL 91 montre que les taux de RC obtenus avec l'ATRA ou la chimiothérapie sont équivalents mais le devenir à long terme des patients traités par ATRA est bien meilleur (survie sans événement à 12 mois atteinte par 79% des patients dans le groupe ATRA contre 50% dans le groupe chimiothérapie)²⁰³. Une étude américaine conforte ces résultats²⁰⁴.

L'ATRA semble donc être le traitement miracle de la LAP : en monothérapie, il permet d'obtenir la RC chez 85% des patients. Pourtant, son utilisation seul pose rapidement le problème de l'apparition d'une résistance du fait de la diminution des taux plasmatiques due à une clairance plus rapide. Par conséquent, les rechutes surviennent rapidement, en 3 à 6 mois à peine. De plus, ce traitement provoque une forte élévation du taux de leucocytes pouvant entraîner le décès des patients (ATRA-syndrome ou syndrome de l'acide rétinoïque). Au début des années 1990, de nombreux groupes engagent des études prospectives pour optimiser le traitement des LAP afin d'augmenter encore le taux de RC et

de prolonger la survie. Il en résulte que pour le traitement d'induction, l'ATRA et la chimiothérapie (associant classiquement une anthracycline à la cytarabine) doivent absolument être utilisés en association car le risque de syndrome rétinopique est plus faible et les rechutes sont moins nombreuses. Un traitement de consolidation est nécessaire et consiste en l'administration d'une anthracycline associée à de la cytarabine à forte dose pendant 3 mois. Le traitement d'entretien dure deux ans et peut être différent selon les protocoles comprenant toujours de la chimiothérapie (anthracycline, mercaptopurine, methotrexate) et de l'ATRA en association ou en alternance²⁰⁵⁻²⁰⁸.

En 1992, le deuxième traitement « miracle » de la LAP fait son apparition. L'arsenic est une substance naturelle qui existe sous forme organique et inorganique. Il existe trois formes inorganiques : l'arsenic rouge (As_4S_4 ou réalgar), l'arsenic jaune (As_2S_3 ou orpiment) et l'arsenic blanc (As_2O_3 ou trioxyde d'arsenic). L'arsenic est un poison bien connu mais est aussi une des plus anciennes drogues de la Médecine chinoise. Au cours des 18^{ème} et 19^{ème} siècles, il était administré sous forme de solution de Fowler en association avec du bicarbonate de sodium pour le traitement de la fièvre périodique, de la leucémie myéloïde chronique et de nombreuses autres pathologies. Son utilisation s'est perdue au 20^{ème} siècle du fait de sa toxicité et de l'avènement de la chimiothérapie et de la radiothérapie. Pourtant, de 1996 à 1997, plusieurs études chinoises confirment l'efficacité de l' As_2O_3 en monothérapie dans le traitement des LAP obtenant 73% de RC chez des patients nouvellement diagnostiqués et 52% chez des patients en rechute. L' As_2O_3 est même capable d'induire une RC chez des patients en rechute après avoir reçu l'association ATRA plus chimiothérapie²⁰⁹⁻²¹². D'autres études plus récentes ont confirmé l'efficacité de l' As_2O_3 dans le traitement des LAP où son utilisation en monothérapie permet d'obtenir une RC avec rémission moléculaire (transcrit PML-RARA indétectable en PCR quantitative en temps réel) chez 72 à 91% des patients et une survie sans maladie relativement longue^{213,214}.

L'idée d'associer ATRA, As_2O_3 et chimiothérapie pour augmenter encore le taux de survie sans maladie à 5 ans a très vite fait son émergence. Son administration à deux modèles murins, l'un utilisant des souris transgéniques PML-RARA, l'autre utilisant la lignée NB4, a montré que cette trithérapie prolonge la survie des animaux et réussit même à éradiquer la maladie^{215,216}. Une étude prospective de l'institut d'Hématologie de Shanghai dont les résultats ont été publiés en 2004 a randomisé l'utilisation de l'ATRA, de l' As_2O_3 ou des deux drogues en association à la chimiothérapie d'induction. Des taux de RC identiques (>90%) ont été obtenus dans les trois bras de traitement. En revanche, la durée pour l'obtention de la RC a été significativement plus courte dans le bras trithérapie. De plus, la diminution de la maladie résiduelle (objectivée par le taux de transcrit PML-RARA en PCR quantitative en temps réel) a été beaucoup plus rapide dans ce bras comparé au bras ATRA ou As_2O_3 seul. Cette différence a persisté après le traitement de consolidation. Enfin, les 20 patients traités par la trithérapie sont restés en RC (médiane de suivi de 18 mois) alors que 7 des 37 patients traités par ATRA ou As_2O_3 seul ont rechuté²¹⁷. La supériorité du traitement associant ATRA,

As₂O₃ et chimiothérapie a depuis été confirmée par d'autres études et paraît finalement logique si on s'intéresse à la leucémogénèse de la LAP et aux mécanismes d'action de l'ATRA et de l'As₂O₃^{218,219}.

La translocation t(15 ;17) est détectée chez plus de 95% des patients LAP^{220,221}. Le transcrit de fusion entre les facteurs de transcription PML et RARA qui en résulte joue un rôle essentiel dans la leucémogénèse des LAP contrairement au transcrit RARA-PML, absent dans 10 à 20% des cas ayant une t(15 ;17). La protéine chimérique PML-RARA est capable de former des homodimères et de séquestrer les protéines RXR et PML. Ces homodimères peuvent aussi inhiber un ensemble de gènes indispensables à la différenciation granuleuse en se fixant au niveau de leurs régions régulatrices RAREs (retinoic acide response element) et en recrutant des co-répresseurs de PML et de RARA. De plus, des études récentes ont montré que PML-RARA peut aussi recruter des méthylases responsables de l'hyperméthylation des promoteurs des gènes en aval de l'acide rétinoïque et donc provoquer l'inhibition de leur transcription²²². Enfin, les études des souris transgéniques pour PML-RARA ont montré que l'expression de ce transcrit de fusion dans le lignage myéloïde est cruciale pour le développement de la LAP, même si des évènements secondaires touchant FLT3 ou Ras sont nécessaires pour le développement complet du phénotype²²³⁻²²⁵. Plus rarement, on peut détecter dans les LAP un transcrit variant PLZF-RARA résultant de la t(11 ;17). La protéine de fusion qui en résulte recrute les co-répresseurs de manière beaucoup plus affine que PML-RARA et inhibe donc la transcription d'une manière drastique²²⁶.

A dose pharmacologique (10⁻⁶ à 10⁻⁷ M), l'ATRA provoque un changement conformationnel de la protéine PML-RARA. Par conséquent, les co-répresseurs ne peuvent plus interagir avec la partie RARA de la protéine chimérique et, au contraire, ce sont des co-activateurs et des histones acétylases qui sont recrutés. La chromatine se retrouve alors en configuration ouverte et la répression transcriptionnelle est levée. Des analyses récentes de transcriptome et de protéome ont confirmé l'effet de l'ATRA dans la modulation des gènes impliqués dans la différenciation granuleuse tels que ceux codant les C/EBP ou les récepteurs de cytokine, ainsi que celle des gènes des voies de signalisation en aval²²⁷. D'autre part, l'ATRA induit aussi la dégradation de la protéine PML-RARA par deux mécanismes complémentaires : le clivage par les caspases et l'adressage au protéasome après ubiquitination²²⁸⁻²³⁰. Dans le cas des LAP avec t(11 ;17), l'exposition à une forte dose d'ATRA ne suffit pas à induire un changement conformationnel du transcrit PLZF-RARA permettant l'échange des co-régulateurs. En revanche l'association de l'ATRA avec un HDACi tel que le SAHA lève non seulement l'inhibition transcriptionnelle mais induit aussi la différenciation terminale^{223,231}.

Les premières expériences réalisées *in vitro* pour étudier les effets de l'As₂O₃ ont révélé que ce composé agit selon un effet-dose sur les cellules APL : à forte concentration (1 à 2.10⁻⁶ M), l'As₂O₃ induit l'apoptose des cellules alors qu'à faible concentration (0,25 à 0,5.10⁻⁶ M) et

dans le cas d'un traitement à long terme, il induit leur différenciation²¹⁰. Les études pharmacocinétiques, le traitement des souris PML-RARA et l'observation des moelles de patients traités ont montré ensuite qu'aux doses où l'As₂O₃ était administré, ces deux effets étaient également observés in vivo et pouvaient donc expliquer l'efficacité de ce traitement²³². Les propriétés pro-apoptotiques de l'As₂O₃ ont été étudiées par de nombreuses équipes et se sont révélées complexes et très variées. Ainsi, cette molécule est capable d'activer les caspases, la voie JNK, l'échangeur d'anion 2 et la protéine GSTP1-1²³³⁻²³⁶. Elle peut aussi up-réguler les gènes impliqués dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et dans les dommages oxydatifs de l'ADN²³⁷. L'As₂O₃ inhibe l'activation de NF-κB, down-régule les gènes WT1, hTERT (human telomerase reverse transcriptase gene) et c-Myc²³⁸⁻²⁴⁰. Enfin, une voie de régulation de l'apoptose médiée par l'As₂O₃ impliquant ATR, PML, Chk2 et p53 a même été proposée récemment²⁴¹.

L'As₂O₃ agit spécifiquement sur les cellules APL alors qu'il n'a aucune efficacité dans les autres sous-types de LAM, ce qui indique un effet direct de cette molécule sur la protéine de fusion PML-RARA. Effectivement, il provoque spécifiquement la dégradation de PML-RARA, de PML mais pas de RARA dans ces cellules car il induit la sumoylation de PML qui permet l'adressage de cette protéine au protéasome où elle est détruite, qu'elle soit sous-forme sauvage ou fusionnée à RARA²³². Nous voyons ici une explication simple à la synergie de l'association ATRA+As₂O₃: chacune de ces drogues cible l'oncoprotéine PML-RARA pour induire sa dégradation, mais l'ATRA agit sur la moitié RARA pendant que l'As₂O₃ agit sur la moitié PML (**figure 9**). Cependant, les techniques d'arrays ont largement contribué à décrypter les mécanismes d'action de l'ATRA et de l'As₂O₃ et ont mis en lumière les multiples autres raisons de leur effet synergique. Les études de protéome et de transcriptome ont montré que l'As₂O₃ module l'expression de nombreux gènes, dont la plupart d'ailleurs sont communs avec ceux modulés par l'ATRA, mais qu'il est surtout responsable de modifications protéiques qui sont la clé de son mécanisme d'action moléculaire. Ainsi, l'ATRA agit essentiellement en modulant l'expression de gènes alors que l'As₂O₃ agit au niveau protéique.

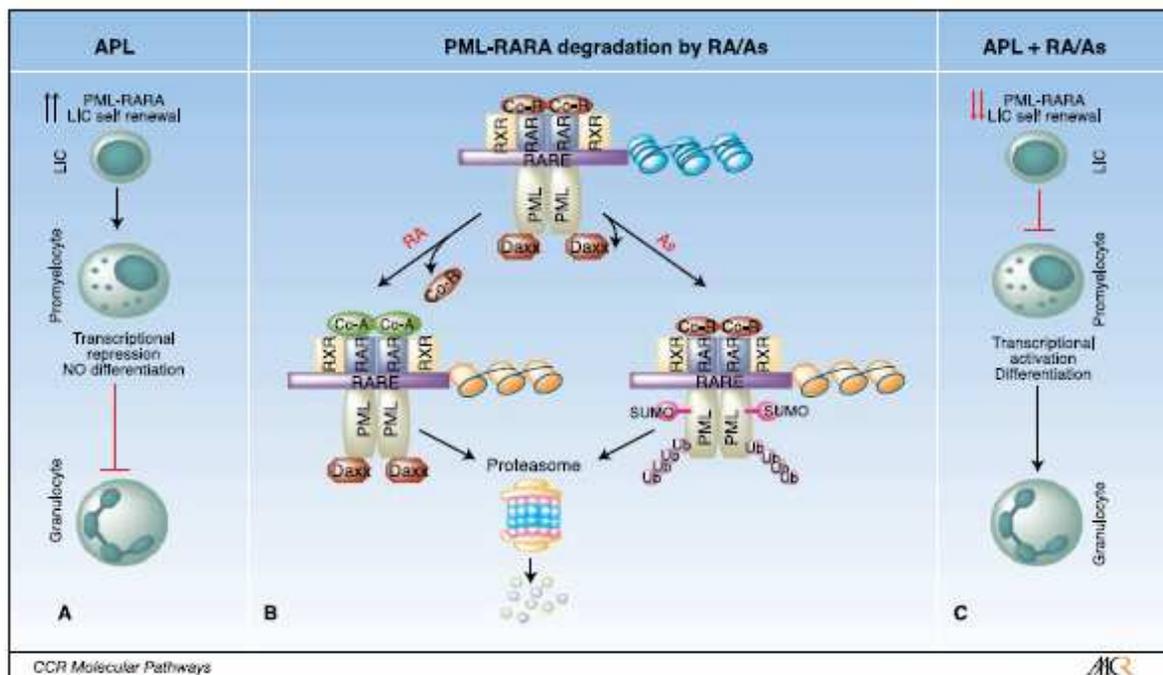


Fig. 1. APL pathogenesis and mechanisms of action of the curable combination RA-As. **A**, APL is characterized by the expression of *PML/RARA* that confers self-renewal properties to committed cells and blocks promyelocyte differentiation. **B**, in APL cells, *PML/RARA* heterodimerize with RXR and recruit corepressors onto master genes that control promyelocyte differentiation. RA releases corepressors and recruits the coactivators, leading to transcriptional activation of targets and differentiation. RA also induces the recruitment of the proteasome that degrades *PML/RARA*. Arsenic enhances sumoylation of *PML/RARA* on Lys 160, which modulates Daxx binding (and thus repression), but also triggers SUMO-dependent polyubiquitination proteasome-dependent degradation of PML and *PML/RARA*. This will modulate Daxx binding to *PML/RARA*, leading to the release of transcriptional repression. **C**, *PML/RARA* degradation is responsible for the eradication of APL LIC. RA and As also induce *PML/RARA* transcriptional activation that leads to the differentiation of promyelocytes. However, only loss of LIC self-renewal is correlated to the cure from APL.

Figure 9 : Mécanismes d'action de l'ATRA et du trioxyde d'Arsenic (Nasr R. et al. Clinical Cancer Research 2009).

Plusieurs exemples peuvent illustrer le mode d'action synergique entre l'ATRA et l'As₂O₃. Ainsi, la lignée NB4-LR1 est résistante à la différenciation. L'ATRA n'a qu'un effet anti-prolifératif sur cette lignée par la down-régulation de la télomérase. En revanche, l'association ATRA+As₂O₃ réussit à induire l'apoptose de la lignée par down-régulation de la télomérase et raccourcissement des télomères^{242,243}. Dans les cellules de LAP, l'ATRA induit la dégradation d'IκB, inhibiteur de la voie NF-κB, alors que l'As₂O₃ s'oppose au catabolisme d'IκB et diminue l'activité de la voie NF-κB²³⁹. L'As₂O₃ seul n'induit qu'une différenciation partielle des cellules de LAP. La différenciation terminale de ces cellules nécessite la présence d'AMPcyclique qui est induite par l'ATRA²⁴⁴. On peut remarquer également que la combinaison ATRA+As₂O₃ amplifie la voie de signalisation de l'acide rétinoïque par l'activation croisée de nombreuses autres voies telles que celles de l'IFN, du calcium, de l'AMPcyclique, des MAPK/JNK/p38, du G-CSF ou du TNF. Elle active aussi la voie du protéasome et inhibe de nombreux gènes ou protéines impliqués dans le cycle cellulaire et la prolifération, notamment ceux de la voie MAPK/JNK/p38. Enfin, l'ATRA augmente

l'expression membranaire de l'AQP9 (arsenic channel aquaglyceroporin 9) permettant une meilleure pénétration de l'As₂O₃ à l'intérieur des cellules²⁴⁵.

2.3. Induction de la différenciation monocyttaire par la vitamine D et ses dérivés

La vitamine D est une hormone stéroïde pléiotrope dont le métabolite le plus actif est le calcitriol (ou 1 α ,25(OH)₂D₃²⁴⁶. Le rôle physiologique majeur attribué au calcitriol est la régulation du métabolisme phosphocalcique et la minéralisation osseuse associée²⁴⁷. Il peut agir selon un mode autocrine et paracrine. La première étape de la synthèse du calcitriol commence au niveau de la peau où les UV transforment le 7-dehydrocholestérol en cholecalciférol ou vitamine D₃ (**Figure 10**). La vitamine D₃ subit ensuite une première hydroxylation au niveau du foie par les 25-hydroxylases mitochondriales et microsomales codées par le gène CYP27A1. Il en résulte le 25-hydroxycholécalférol (25(OH)D₃) qui est alors 1 α -hydroxylé au niveau du rein par la 1 α -hydroxylase codée par le gène CYP27B1 pour finalement aboutir au calcitriol, sécostéroïde actif. La 1 α -hydroxylase est exprimée aussi dans d'autres tissus tels que le colon, le cerveau, le pancréas, les ganglions, la peau ou le placenta permettant ainsi une synthèse locale de calcitriol. La 24-OHase du cytochrome P450 codée par le gène CYP24A1 peut hydroxyler le 25(OH)D₃ et le 1 α ,25(OH)₂D₃ et constitue une étape limitante du catabolisme de ces deux molécules²⁴⁸. De plus, il existe un rétrocontrôle négatif de la concentration de calcitriol : une augmentation de 24,25(OH)₂D₃ induit la synthèse de calcitriol tandis que les ions Ca²⁺, le phosphore inorganique et le calcitriol lui-même inhibe sa synthèse. L'expression du gène CYP27B1 est induite par la parathormone (PTH) et inhibée par le calcitriol²⁴⁹. L'expression du gène CYP24A1 est up-régulée directement par le calcitriol pour produire les métabolites de la vitamine D moins actifs qui sont le 1 α ,24,25(OH)₃D₃ et le 24,25(OH)₂D₃.

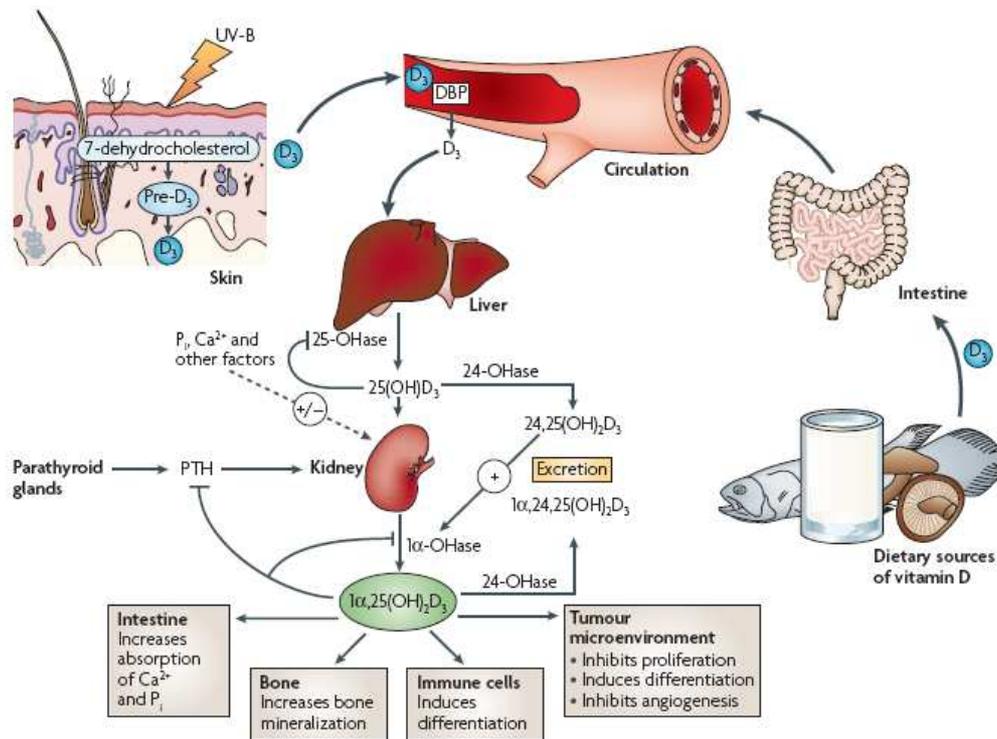


Figure 10 : Le métabolisme de la vitamine D (K. Deeb, Nature Reviews Cancer 2007).

La fonction principale du calcitriol est de moduler la transcription de gènes cibles mais il doit pour cela se lier au VDR (vitamin D receptor)²⁵⁰. Le VDR appartient à la superfamille des récepteurs des hormones stéroïdiennes et est composé de 6 domaines (**Figure 11**). Un domaine de localisation nucléaire lui permet d'être guidé du cytoplasme vers le noyau en cheminant le long des microtubules jusqu'aux pores nucléaires²⁵¹. Une fois que le calcitriol est attaché au VDR au niveau de son domaine de liaison, le complexe est stabilisé par phosphorylation de la sérine 51 par la PKC et de la sérine 208 par la caséine kinase II au niveau du domaine de liaison à l'ADN^{252,253}. La liaison du VDR au RXR s'effectue grâce à un domaine de dimérisation.

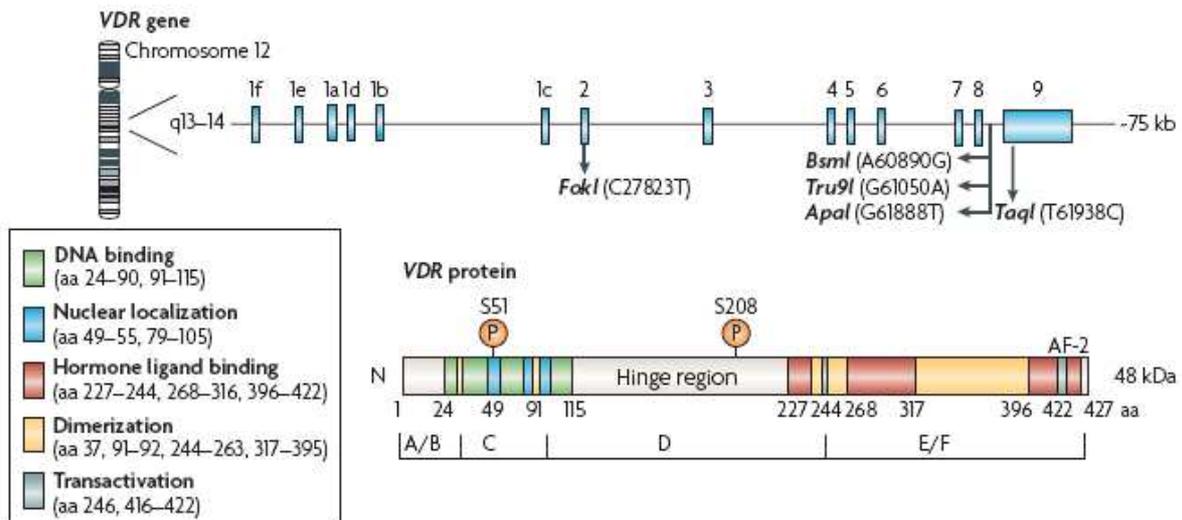


Figure 11 : Le récepteur de la vitamine D (K. Deeb, Nature Reviews Cancer 2007).

Le complexe calcitriol-VDR-RXR peut alors exercer son activité transcriptionnelle en se fixant au niveau des séquences VDRE (vitamin D responsive element) présentes dans les promoteurs des gènes cibles (**figure 12**). Pour une activation transcriptionnelle, le VDR occupe l'extrémité 3' et le RXR l'extrémité 5' du VDRE. Les phosphorylations qui découlent de la fixation du calcitriol au VDR induisent un changement conformationnel du VDR responsable du relargage de co-répresseurs qui maintenaient la chromatine en structure fermée. Le domaine AF2 (activation function 2) d'activation du VDR est alors capable de se lier à des coactivateurs des récepteurs aux stéroïdes (SRC) et aux protéines SKIP (nuclear coactivator SKI interacting protein), CBP (CREB binding protein) et PBAF (polybromo-and SWI-2-related gene a associated factor) qui acétylent les histones et modifient la chromatine en structure ouverte²⁵⁴. Ensuite, les protéines DRIPs (vitamin D receptor interacting complex) se lient au domaine AF2 du VDR et peuvent alors interagir avec les divers acteurs de la machinerie transcriptionnelle tels que TF2B (transcription factor 2B) et l'ARN polymérase II²⁴⁸. Cette importante machinerie transcriptionnelle favorise alors la transcription de gènes tels que CDKN1A (codant p21, inhibiteur de kinase cycline dépendant), CYP24A1 (codant la 24-OHase) ou SPP1 (codant l'ostéopontine). Les mécanismes dans le cas d'une inhibition transcriptionnelle où le VDR occupe alors l'extrémité 5' du VDRE, sont moins bien connus^{255,256}. Dans ce cas de la répression des gènes codant CYP27B1 et la PTH, le complexe calcitriol/VDR s'associe au VDIR (VDR-interacting repressor) et l'ensemble se fixe au niveau des séquences VDRE négatives (nVDRE) présentes dans les promoteurs des gènes cibles à inhiber²⁵⁷. L'association VDR/VDIR induit la dissociation du complexe activateur histone acétyltransférase et provoque le recrutement du complexe répresseur histone déacétylase. De plus, le facteur de transcription WSTF (Williams syndrom transcription factor) favorise la trans-répression par l'association avec le complexe WINAC, un complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant²⁵⁸.

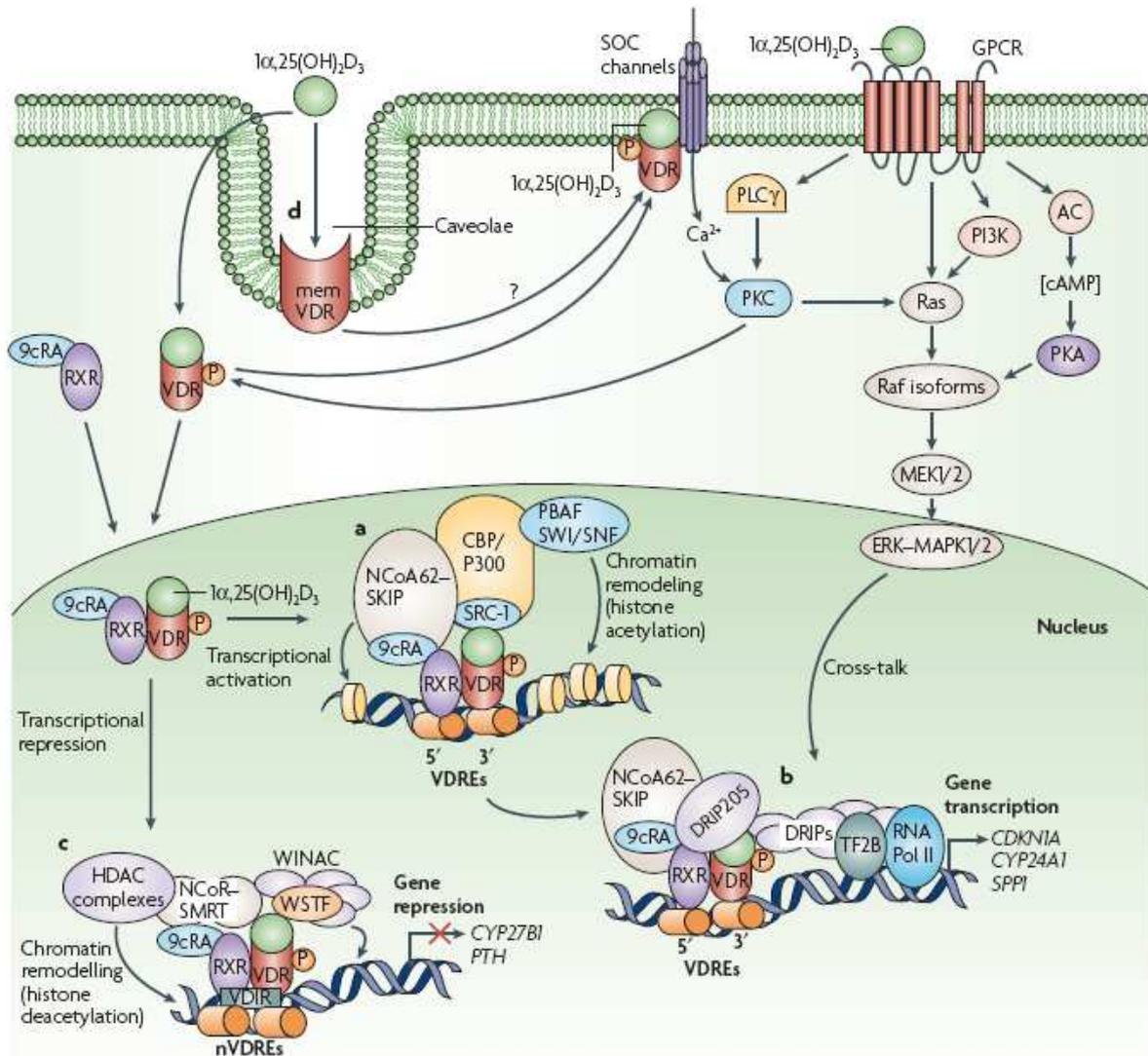


Figure 12 : Les régulations transcriptionnelles médiées par le calcitriol (K. Deeb, Nature Reviews Cancer 2007).

Le calcitriol augmente et inhibe l'expression de nombreux proto-oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs dans les tissus sains et tumoraux. Pourtant, très peu d'entre eux possèdent des séquences VDRE dans leur promoteur. Il apparaît donc clairement que la vitamine D3 peut agir en modulant des cascades de signalisation ou par d'autres mécanismes non génomiques jusqu'à lors inconnus.

Les actions non génomiques de la vitamine D sont rapides et ne dépendent pas de la transcription. Elles peuvent toutefois moduler des voies de signalisation qui elles-mêmes pourront moduler la transcription^{259,260}. Il n'existe pas de consensus à propos de l'origine de ces mécanismes mais il semblerait qu'ils puissent débuter au niveau de la membrane plasmique grâce à un VDR membranaire (memVDR). Ce récepteur a notamment été mis en

évidence au niveau des cavéoles intestinales et permettraient l'absorption rapide des ions Ca^{2+} ²⁶¹. L'interaction du calcitriol avec le memVDR activerait la voie de signalisation PKC qui provoquerait l'ouverture rapide des canaux calciques voltage-dépendant et l'augmentation du calcium intracellulaire. Cet afflux de calcium peut activer la cascade de signalisation raf-MEK (mitogen activated protein kinase extracellular signal regulated kinase kinase)-MAPK (mitogen activated protein kinase)-ERK (extracellular signal regulated kinase) responsable de la prolifération cellulaire²⁶². De plus, ERK est capable d'augmenter l'activité transcriptionnelle du VDR et l'activation des PKC contribue à la stabilisation du VDR²⁶³. Ainsi, les mécanismes d'action non génomiques de la vitamine D peuvent coopérer avec les mécanismes génomiques classiques.

Le catabolisme de la vitamine D est perturbé dans un certain nombre de cancers. Ainsi, l'expression du gène CYP27B1 est augmentée dans les cancers du sein, de la prostate et au cours de la progression des cancers du colon à un stade précoce alors qu'elle est diminuée dans les carcinomes coliques différenciés²⁶⁴⁻²⁶⁶. L'augmentation de CYP27B1 pourrait contribuer à une synthèse locale de calcitriol à partir de 25(OH)D3 ayant un effet protecteur antitumoral. Seulement, l'expression de CYP24A1 est aussi augmentée dans ces tumeurs et peut s'opposer à cet effet protecteur en diminuant la synthèse locale de calcitriol. Une étude a montré que dans les cancers colorectaux de haut grade, CYP27B1 est down-régulé tandis que CYP24A1 est up-régulé²⁶⁷. Dans le cancer du sein, la région chromosomique 20q13.2 où se situe le gène CYP24A1 est amplifiée et l'expression de l'ARN messenger de CYP24A1 est augmentée dans les cancers du poumon, du colon et de l'ovaire, ce qui suggère une réduction du niveau de calcitriol dans toutes ces tumeurs²⁶⁸⁻²⁷⁰. Toutes ces observations sont à mettre en relation avec les propriétés anti-tumorales de la vitamine D qui ont été démontrées dans plusieurs modèles de cancers. Ainsi, dans un modèle murin reproduisant la carcinogénèse de la prostate, l'administration de calcitriol retarde la survenue de néoplasies intra-épithéliales et ses effets antitumoraux sont plus efficaces lorsqu'il est administré à un stade précoce de la maladie²⁷¹. D'autres études utilisant des modèles de cancer de l'ovaire, du sein, du poumon ou de carcinome à cellules squameuses ont démontré les propriétés anti-tumorales du calcitriol et de ses analogues. Il apparaît que tout ces effets passent par le VDR et régulent la prolifération, l'apoptose et l'angiogénèse²⁷²⁻²⁷⁵.

L'activité anti-proliférative du calcitriol dans les cellules tumorales provient essentiellement d'une perturbation du cycle cellulaire. La progression dans le cycle cellulaire est régulée par les cyclines, les cycline-dépendantes kinases (CDK) et les inhibiteurs de CDK (CKI). L'expression des CKI p21 (CDKN1A) et p27 (CDKN1B) inhibe la prolifération cellulaire en arrêtant le cycle à la transition G0/G1. Le promoteur de CDKN1A contient un VDRE fonctionnel et constitue donc une cible transcriptionnelle directe du calcitriol²⁴⁶. Le traitement de la lignée leucémique U937 par le calcitriol induit l'expression de p21, bloque le cycle cellulaire et induit la différenciation des cellules en macrophages²⁷⁶. Dans la lignée de cancer du sein MCF7, le calcitriol augmente l'expression de p21 et de p27 tandis qu'il

diminue l'expression des cyclines D1, D3, A1 et E1. Il en résulte une inhibition de l'activité des CDK et l'hypophosphorylation de pRb²⁷⁷. De la même manière, l'exposition des cellules SCC au calcitriol provoque un arrêt du cycle en G0/G1 lié à l'activation de p27 et à l'hypophosphorylation de pRb²⁷⁸. Dans ce cas cependant, l'expression de p21 est diminuée indiquant que certaines des modifications induites par le calcitriol sont dépendantes du type cellulaire. D'autres gènes tels que GADD45 (impliqué dans la réponse aux dommages de l'ADN), les CKI de la famille INK4a (impliqués dans l'arrêt du cycle en G1), voient leur expression augmentée par le calcitriol dans le cas du cancer du colon, de l'ovaire ou dans les leucémies²⁷⁹. A l'opposé, le proto-oncogène Myc, les gènes TYMS (thymidylate synthetase) et TKI (thymidylate kinase) impliqués dans la réplication de l'ADN, le gène SKP2 (S-phase kinase associated protein 2) et celui de l'ubiquitine ligase, qui adresse les CKI au protéasome sont tous down-régulés par le calcitriol²⁸⁰⁻²⁸². Même s'il semble que le calcitriol provoque toujours un arrêt du cycle cellulaire dans les cellules tumorales, il est impossible de trouver un mécanisme univoque, les effets étant très variables d'un type cellulaire à l'autre.

Dans un certain nombre de cancers, et particulièrement dans les LAM, l'arrêt du cycle cellulaire provoqué par le calcitriol s'accompagne de différenciation cellulaire. Depuis le début des années 1980, de nombreuses études ont rapporté l'induction par le calcitriol de la différenciation en monocytes-macrophages des lignées leucémiques HL60, U937 et THP-1^{180,283-287}. Cette différenciation attribuable à des effets VDR dépendants se traduit par des modifications morphologiques et cytochimiques, l'expression de marqueurs de différenciation tel que le CD14²⁸⁸ et de gènes spécifiques du lignage monocyttaire. Les voies de signalisation activées n'ont été identifiées qu'assez récemment et la voie des MAPkinases semble jouer un rôle majeur dans ce phénomène notamment en provoquant l'up-régulation de pRb et de C/EBP β ^{289,290}. D'autres travaux ont rapporté l'implication de la PI3kinase et de mécanismes non génomiques dans la réponse rapide des lignées leucémiques au calcitriol se traduisant par une up-régulation de leur expression du VDR²⁹¹. La différenciation pourrait aussi découler de la formation de complexes entre le VDR activé et la PI3kinase²⁹². Les travaux sur la différenciation leucémique induite par le calcitriol sont très nombreux mais le mécanisme exact de ce phénomène n'est toujours pas clairement élucidé. Dans les autres cancers, le calcitriol et ses analogues exercent également des effets différenciants. Ainsi, le traitement de lignées cellulaires de cancer du colon²⁸⁰ ou de la prostate²⁹³ provoque la réexpression de gènes exprimés sur la cellule différenciée d'origine. Dans le cancer du colon, l'induction de la différenciation est due à l'activation des voies PKC et JNK²⁹⁴. Elle régule également l'expression des inhibiteurs de liaison à l'ADN, ID1 et ID2, qui sont des régulateurs transcriptionnels de la prolifération (ID1) et de la différenciation (ID2) des cellules épithéliales. L'inhibition d'ID2 facilite les effets antiprolifératifs du calcitriol²⁹⁵. Enfin, Palmer rapporte que, dans la lignée de cancer colorectal SW480, le calcitriol induit la différenciation en augmentant l'expression de la E-cadhérine. Il en découle une inhibition de la croissance cellulaire car la β -caténine est transloquée du noyau vers le cytoplasme, n'agit plus sur la machinerie transcriptionnelle et laisse libre champ au VDR pour le faire²⁹⁶. Il apparaît à

nouveau que l'induction de la différenciation par le calcitriol est loin d'être univoque et dépend largement du type cellulaire.

La vitamine D exerce ses propriétés antitumorales en induisant l'apoptose, soit par l'inhibition des protéines anti-apoptotiques BCL2 et BCL-XL, soit par l'induction des protéines pro-apoptotiques BAX, BAK et BAD. Des études ont montré que le calcitriol inhibe l'expression de BCL2 dans les lignées MCF7 et HL60 alors qu'il augmente l'expression de BAX et BAK dans les cellules de cancer de la prostate, d'adénomes et de carcinomes colorectaux²⁹⁷. Le calcitriol peut aussi induire l'apoptose *via* l'activation des caspases : le traitement des carcinomes à cellules squameuses murins augmente l'expression du VDR et inhibe la phosphorylation de ERK car la kinase MEK, en amont de ERK, est clivée par l'activation des caspases²⁹⁸. L'interruption de cette voie pro-proliférative provoque l'apoptose des cellules. Plus récemment un nouveau mécanisme pro-apoptotique a été attribué au calcitriol : dans les cellules de cancer de l'ovaire, il déstabilise l'ARN messager de la télomérase reverse transcriptase (TERT) ce qui conduit au raccourcissement des télomères du fait de la perte de l'activité télomérase et aboutit à la mort cellulaire²⁹⁹. Les mécanismes par lesquels le calcitriol induit l'apoptose sont multiples et leur description détaillée demeure un challenge (**figure 13**).

Le calcitriol inhibe la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* et réduit l'angiogénèse *in vivo*^{300,301}. Dans un modèle de souris xénotreffées avec la lignée MFC7 surexprimant le VEGF, le calcitriol inhibe la formation des tubes cellulaires endothéliaux induite par le VEGF et ralentit la croissance tumorale³⁰². Il up-régule l'ARNm du VEGF dans les cellules vasculaires des muscles lisses ainsi que celui de la thrombospondine (facteur anti-angiogénique) dans la lignée SW480³⁰³. Dans les cellules SCC, il induit l'IL-8 (facteur angiogénique) alors qu'il interrompt la signalisation de l'IL-8 dans les cellules de cancer de la prostate, inhibant ainsi la migration des cellules endothéliales et la formation des tubes^{304,305}. Dans les modèles murins de cancer de la prostate et du poumon, le calcitriol empêche le développement des métastases grâce, entre autres, à ses propriétés anti-angiogéniques^{272,275}. Enfin, le calcitriol induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules endothéliales dérivées de tumeurs (TDEC) alors que les cellules endothéliales isolées de tissus sains sont résistantes à ses effets³⁰⁰. Chung a démontré récemment que cette différence de sensibilité pouvait être due à l'extinction par mécanisme épigénétique du gène CYP24A1 dans les TDEC³⁰⁶. Il demeure néanmoins que le calcitriol a des propriétés anti-tumorales en agissant sur les cellules endothéliales, ce que démontrent plusieurs modèles murins.

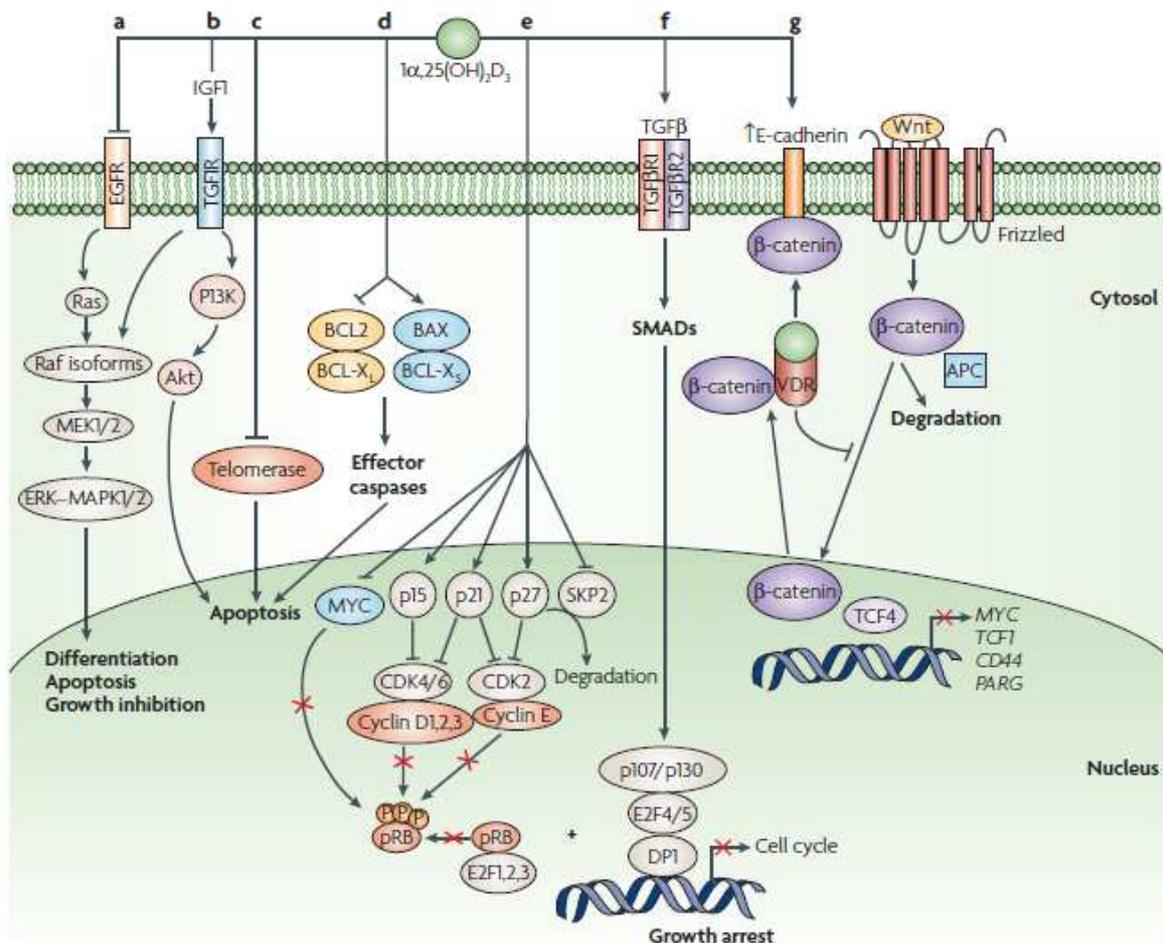


Figure 3 | **Key cancer-related signalling pathways targeted by $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.** $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibits mitogen-activated protein kinase (MAPK)–extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1 and 2 signalling through suppression of epidermal growth factor (EGFR; **a**) and insulin-like growth factor 1 (IGF1; **b**), which both target Ras. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induces apoptosis through the IGF1R–phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)–Akt-dependent signalling pathway (**b**), inhibiting telomerase (**c**), downregulating BCL2, inducing BAX and activating caspase cleavage (**d**). Cell-cycle progression is perturbed by $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ through S-phase kinase-associated protein ubiquitin ligase (SKP2; targeting p27 for degradation; **e**), and MYC, which results in pRB dephosphorylation; and transforming growth factor- β (TGF β ; **f**) cross-talk. Cell-cycle perturbation by $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ultimately affects the association of retinoblastoma pocket proteins (pRB and p107/p130) and the E2F family of transcription factors and DP polypeptide (DP1) heterodimers that mediate the transcription of cell-cycle genes. Association of E2F1, 2 and 3 with pRB in its hypophosphorylated state and interaction of the E2F4 and 5 transcriptional repressors and DP1 with p107/p130 prevent transcription of cell-cycle genes and restrain cell-cycle progression. Activation of VDR by $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induces the expression of E-cadherin (**g**), thereby promoting the translocation of β -catenin from the nucleus to the plasma membrane and competing with T-cell transcription factor 4 (TCF4) for β -catenin binding; thus inhibiting the Wnt– β -catenin–TCF4 signalling pathway, which leads to the induction of MYC, TCF1 (transcription factor 1), CD44 and PPARG (peroxisome proliferator-activated receptor- γ). APC, adenomatosis polyposis coli; CDK, cyclin-dependent kinase; pRB, phosphorylated retinoblastoma; Wnt, wingless-related MMTV integration site.

Figure 13 : Voies de signalisation impliquées dans les propriétés antitumorales du calcitriol (K. Deeb, Nature Reviews Cancer 2007).

Les propriétés antitumorales du calcitriol s'avèrent être particulièrement intéressantes quand cette molécule est associée à la chimiothérapie. Plusieurs essais pré-cliniques ont ainsi démontré une action synergique entre le calcitriol et différentes classes

d'anticancéreux en remarquant toutefois que cette synergie n'est observée que lorsque le calcitriol est administré avant ou simultanément avec la chimiothérapie. Son ajout après l'administration de l'agent chimiothérapeutique n'apporte aucun bénéfice^{307,308}. La combinaison du calcitriol avec le cisplatine induit l'apoptose des cellules SCC *in vitro* par l'up-régulation de MEKK1 (MAPkinase kinase kinase 1)²⁹⁸. Ce mécanisme est décrit lorsque le calcitriol est utilisé seul, mais est potentialisé par les sels de platine. Il semble donc que le traitement par le calcitriol engage les cellules vers l'apoptose et que ce signal est amplifié et mené à son terme par l'ajout ensuite de l'agent génotoxique. La même observation est faite avec le traitement des cellules MFC7 par l'association d'un analogue de la vitamine D3 avec la doxorubicine ou les radiations ionisantes³⁰⁹. Dans ce modèle, l'analogue de la vitamine D3 augmente la cytotoxicité de la doxorubicine en bloquant l'induction de p53. Le calcitriol et ses analogues sensibilisent également les cellules SCC et MCF7 aux effets des taxanes (paclitaxel et docetaxel) en diminuant de manière significative l'expression de p21³⁰⁸. Dans les cellules de cancer de la prostate, une synergie d'action est observée entre le calcitriol et le paclitaxel, mais les effets du calcitriol ont surtout été remarqués parce qu'il induit une down-régulation de la cyclo-oxygénase 2 (COX2)³¹⁰. Cette inhibition entraîne une diminution de l'activité des prostaglandines, induit leur dégradation par la 15-OH-prostaglandine deshydrogénase et réduit l'expression du récepteur aux prostaglandines. Ces observations constituent un rationnel fort pour envisager l'introduction de calcitriol et d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (inhibiteurs des COX) dans le traitement du cancer de la prostate. L'ensemble de ces observations pré-cliniques a évidemment abouti au développement d'essais cliniques utilisant le calcitriol comme anti-cancéreux dans des pathologies où la chimiothérapie seule apparaît insuffisamment active.

Le cancer de la prostate est probablement la tumeur solide ayant fait l'objet du plus grand nombre d'essais cliniques utilisant le calcitriol. Les résultats d'un essai clinique de phase II ont ainsi été publiés dès 1995 (Osborn et al., 1995). Parmi les 14 patients atteints de cancer réfractaire ayant reçu une dose quotidienne de calcitriol (0,5µg à 1,5µg/jour), aucune réponse n'a été observée et une hypercalcémie est survenue. Pourtant, d'autres essais de phase II ont suivi dans lesquels les associations calcitriol+carboplatine ou calcitriol+docetaxel étaient testées. Cette dernière combinaison a fait la preuve de son efficacité plus particulièrement dans les cancers de la prostate androgéno-indépendants (qui progressent malgré la castration androgénique) en améliorant la survie des patients et en diminuant les complications thrombo-emboliques³¹¹. Ces résultats doivent cependant être confirmés dans une autre étude car celle-ci n'avait pas pour objectif primaire d'étudier la survie. D'autres tumeurs solides avancées ont fait l'objet d'études de phase I testant les associations du calcitriol avec le paclitaxel ou avec le gefitinib^{312,313}. La majorité de ces essais, basés sur des résultats pré-cliniques très encourageants, se sont pourtant heurtés à un problème majeur : l'hypercalcémie provoquée par le calcitriol. Il se trouve en plus que les études pharmacodynamiques, pharmacocinétiques et de toxicité sont plutôt rares pour la vitamine

D. Plusieurs compagnies ont alors développé des nouvelles formulations et des analogues du calcitriol ainsi que des modulateurs du VDR.

Plusieurs analogues du calcitriol ont été développés et l'analyse de leurs propriétés a montré qu'ils étaient moins hypercalcémogéniques que le calcitriol. Seulement, il s'est avéré que leurs propriétés antitumorales étaient aussi diminuées probablement du fait d'une affinité plus faible pour le VDR³¹⁴. Plusieurs essais ont ainsi testé les effets de l'EB1089 (seocalcitol : 1 α -dihydroxy-22,24-diène-24,26,27-trihomovitamine D3) chez des patients atteints de cancers du sein, d'hépatocarcinomes ou de cancers colorectaux^{315,316}. Cet analogue n'a pas montré d'activité antitumorale et des hypercalcémies ont même été signalées. Les études précliniques ont montré que le paricalcitol (19-nor-1 α ,25-(OH)₂D₂) pouvait être actif dans le cancer de la prostate, du pancréas, du poumon, du sein et dans le myélome multiple³¹⁷. Les essais de phase I ont débuté testant la combinaison paricalcitol+gemcitabine chez les patients ayant des tumeurs solides avancées, ou la combinaison paricalcitol+acide zolédronique dans le traitement du myélome multiple. Ces essais devaient déterminer la sécurité de l'administration intermittente à forte dose de ces associations. Enfin, les modulateurs non-sécostéroïdiens du VDR semblent posséder des propriétés antitumorales tout en induisant moins d'hypercalcémie que le calcitriol^{315,318,319} et constituent donc probablement l'approche antitumorale « vitamine D like » la plus intéressante.

Dans les LAM, les essais précliniques *in vitro* et *in vivo* indiquaient clairement que le calcitriol était capable d'induire la différenciation monocyttaire des lignées leucémiques et des blastes. De plus le succès de l'ATRA dans le traitement des LAP a largement contribué à la mise en place d'essais cliniques testant la capacité du calcitriol à rétablir la différenciation dans les LAM autres que les LAP et les syndromes myélodysplasiques (SMD). Les premiers essais cliniques utilisant le calcitriol en monothérapie démarrent dès le milieu des années 1980. La vitamine D3 induit bien une différenciation des blastes, mais celle-ci n'est que partielle et n'est pas observée chez tous les patients. L'impact sur la survie est modeste si bien que les résultats de ces essais sont globalement décevants^{320,321}. De nouveaux essais sont mis en place pour tester l'efficacité thérapeutique du calcitriol en association avec les drogues de chimiothérapie classiques qui ont fait leurs preuves dans le traitement des LAM et SMD. Ils associent alors le calcitriol à la cytarabine, à l'acide rétinoïque ou à l'hydroxyurée³²²⁻³²⁴. Aucun de ces essais ne montre un réel bénéfice lié à l'apport du calcitriol. De nouveaux espoirs sont placés dans les analogues du calcitriol : une équipe a comparé les propriétés différenciantes de cinq analogues à celles du calcitriol sur des lignées leucémiques et des blastes de patients. Elle rapporte que tous les analogues ont une activité différenciante supérieure à celle du calcitriol. La différenciation qu'ils induisent n'est toutefois que partielle et nécessite leur association à d'autres drogues pour devenir terminale³²⁵. Dans une autre étude *in vitro*, le paricalcitol induit la différenciation de plusieurs lignées leucémiques et agit même en synergie avec l'As2O3, ce qui permet d'envisager son utilisation dans le traitement

des LAP résistantes à l'ATRA³²⁶. Pourtant, les résultats des essais cliniques utilisant ces analogues pour le traitement des LAM et des SMD sont à nouveau très décevants^{327,328}.

Malgré cet état des lieux peu glorieux, l'utilisation du calcitriol dans le traitement des LAM n'est pas terminée. Cette molécule possède des propriétés antitumorales indéniables et présente l'avantage sur la chimiothérapie de ne pas être toxique. De plus, de nombreuses études ont montré que son utilisation clinique aux doses antitumorales, à condition d'être administrée de façon intermittente, n'était pas limitée par l'hypercalcémie. Le calcitriol retrouve donc tout son intérêt dans le traitement des LAM si l'on s'intéresse aux patients non éligibles pour la chimiothérapie intensive (car trop âgés de manière générale) ou pour lesquels le traitement standard a échoué. Ainsi, une étude a testé l'association calcitriol+acide rétinoïque 13-cis+ cytarabine à faible dose chez 26 patients atteints de LAM et 4 patients atteints de SMD. Tous ces patients n'ont pas été traités par chimiothérapie intensive du fait de leur âge trop élevé, d'un état clinique trop dégradé ou par refus. Grâce à ce traitement, 27% des patients ont atteint la rémission complète et une réponse partielle a été obtenue chez 23% des patients. Compte-tenu de leur pathologie, Leur survie pouvait être estimée inférieure à 6 mois. Dans cet essai, la survie médiane des non-répondeurs est de 4 mois alors qu'elle atteint 16 mois chez les répondeurs. 34% des patients sont toujours en vie 2 ans après ce traitement. Les résultats de cette étude doivent évidemment être confirmés sur une cohorte plus grande mais sont très encourageants³²⁹. Une équipe japonaise a rapporté deux cas de patients atteints de LAM ayant rechuté après une greffe de sang de cordon et remis en rémission par un traitement associant le calcitriol à la cytarabine à faible dose³³⁰. L'utilisation du calcitriol pourrait aussi trouver un nouvel attrait avec l'avènement des nouvelles drogues efficaces dans le traitement des LAM. Ainsi, S. Koschmieder décrit une synergie entre le calcitriol et la décitabine, un agent déméthylant ayant montré récemment ses propriétés antileucémiques, pour l'induction de la différenciation myélo-monocytaire de la lignée U937 et de blastes de patients. Ces travaux pourraient être à l'origine d'un nouvel essai clinique³³¹. Enfin, dans une vision plus globale du traitement des LAM, le calcitriol présente aussi l'avantage d'induire de manière drastique l'expression de la cathélicidine, un peptide antimicrobien. Le management des patients leucémiques traités par chimiothérapie pose de réels problèmes infectieux et le calcitriol apparaît comme un moyen de lutter contre les infections³³²⁻³³⁴.

3. Le ciblage de l'homéostasie du fer en cancérologie

3.1. Le cycle du fer

Le fer est un élément essentiel impliqué dans de nombreux processus biologiques parmi lesquels figurent la synthèse de l'ADN, le transport des électrons ou l'érythropoïèse. Il existe sous deux états d'oxydation, le fer ferreux Fe^{2+} ou Fe(II) et le fer ferrique Fe^{3+} ou Fe(III) . Sa capacité à passer d'un état à l'autre en donnant ou en acceptant un électron est fondamentale pour toutes les fonctions biologiques auxquelles il participe. Chez l'Homme, 25 à 30% du fer contenu dans le corps est lié à la ferritine, protéine dédiée au stockage du fer. Quand les besoins cellulaires en fer augmentent, la ferritine relargue le fer qui se lie alors à une protéine de transport sérique, la transferrine.

La présence de fer libre est délétère pour l'organisme en raison de sa capacité à produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) pouvant interagir avec l'ADN, les protéines et les lipides et pouvant donc produire des mutations et des dommages cellulaires. Il faut toutefois noter qu'il existe une certaine confusion entre les « ROS » et le stress oxydatif³³⁵. En effet, nos cellules d'organisme aérobie utilisent l'oxygène pour produire de l'énergie et cet oxygène sert d'accepteur final aux électrons produits lors de ce phénomène. La réduction des molécules d'oxygène en eau est catalysée par la cytochrome oxydase, dernière enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale. Une petite fraction de cet oxygène échappe à cette réduction, ce qui aboutit à la formation d'anion superoxyde (O_2^-) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces ROS relativement inactifs sont alors pris en charge par d'autres systèmes enzymatiques spécifiques. Le peroxyde d'hydrogène à faible concentration participe également à diverses voies de signalisation et favorise la prolifération cellulaire^{336,337}. Il arrive malheureusement parfois que ces systèmes enzymatiques soient débordés, l'équilibre redox est rompu et la cellule se retrouve alors en situation de stress oxydatif. L'excès d' H_2O_2 est particulièrement dangereux en présence de fer puisque, selon la réaction de Fenton, ces deux éléments vont interagir pour produire des radicaux hydroxyl ($\cdot\text{OH}$) très toxiques.



Ainsi, dans l'organisme, le fer est toujours associé à des protéines qui l'empêchent de participer à ces réactions d'oxydo-réduction (redox) pouvant produire des ROS extrêmement réactifs tels que les radicaux hydroxyls. En conséquence de ces réactions, l'excès de fer est clairement identifié comme un facteur de risque de développer un cancer. De nombreuses

études ont établi une corrélation entre l'excès de fer stocké dans l'organisme et la survenue de cancers du colon, du foie, du rein, du poumon ou de l'estomac³³⁸.

L'absorption du fer a lieu au niveau du duodénum selon deux voies différentes, l'une pour le fer hémique, l'autre pour le fer non hémique³³⁹. La capture du fer par les entérocytes nécessite la transformation du Fe(III) en Fe(II) par la ferriréductase Dcytb. Les souris ko pour cette enzyme n'ont pas de défaut d'absorption du fer alimentaire, ce qui suggère l'existence d'une ferriréductase alternative³⁴⁰. Le Fe(II) est ensuite pris en charge par le transporteur DMT1 présent au niveau du pôle apical des entérocytes et introduit dans ces cellules³⁴¹ (**figure 14**).

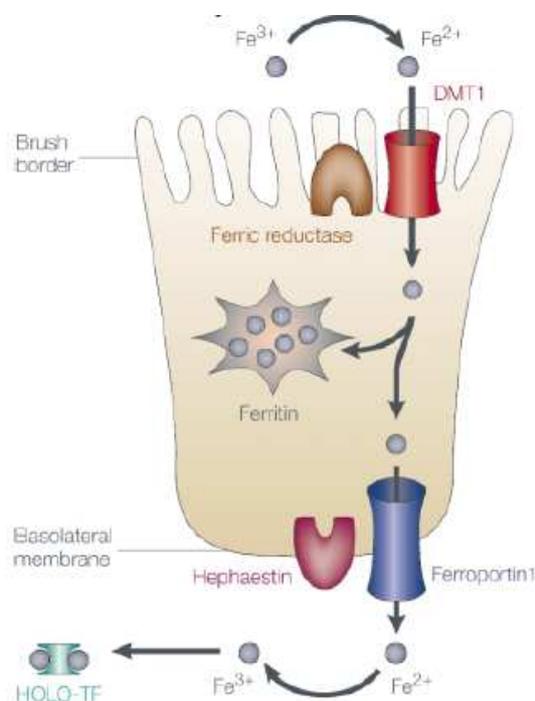


Figure 14 : Transport du fer dans les entérocytes du duodénum (N.C. Andrews, Nature reviews Genetics 2000).

L'entrée du fer dans les entérocytes est régulée au niveau de l'ARN messager par le système IRP1/IRP2, régulateur-clé de l'homéostasie du fer³⁴² (**figure 15**). Les protéines IRP1 et IRP2 (IRP pour Iron Regulatory Protein) se fixent de manière spécifique à une séquence IRE (Iron Regulatory Element) hautement conservée et présente dans les régions non traduites des ARNm de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme du fer. Lorsque la séquence IRE est située dans la région 3' de l'ARNm, la fixation des IRP stabilise l'ARNm et augmente sa traduction. En revanche, lorsque la séquence IRE est présente dans la région 5' de l'ARNm, la fixation des IRP inhibe sa traduction. Les IRP se fixent aux séquences IRE quand

la concentration en fer est faible et perdent cette capacité quand la concentration en fer est élevée. L'ARNm de DMT1 comporte une séquence IRE dans sa partie 3' de telle sorte que lorsque le niveau de fer est trop faible dans les entérocytes, la synthèse de DMT1 s'accroît et la quantité de fer capturée augmente. Il existerait au niveau du pôle apical des entérocytes une protéine capable de capturer le fer hémérique³⁴³. La relevance physiologique de cette protéine HCP1 (haem carrier protein 1) n'a pas été clairement démontrée, d'autant qu'elle serait capable de transporter également les folates^{344,345}.

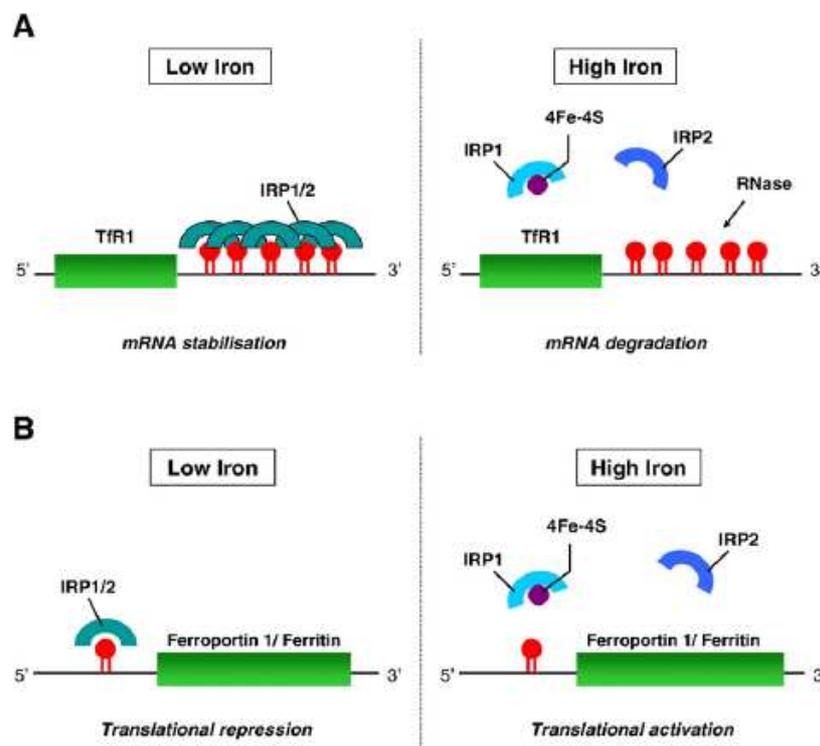


Figure 15 : Le système de régulation IRE/IRP (D.R. Richardson *et al.* Biochimica et Biophysica Acta 2009).

Le fer transporté par DMT1 vient grossir le pool de fer labile intracellulaire résultant de l'équilibre redox entre le Fe(II) et le Fe(III) où le fer serait lié à différents ligands de bas poids moléculaire, à des molécules chaperonnes ou à des organelles. La nature exacte du pool de fer labile demeure inconnue³⁴⁶. Le fer en est libéré lorsqu'il est exporté dans la circulation sanguine grâce à la ferroportine, transporteur présent au niveau de la membrane basolatérale des entérocytes³⁴⁷. Un autre transporteur, l'héphaestine, participe également à l'export sanguin du fer³⁴⁸. La ferroportine est aussi exprimée sur la membrane des macrophages hépatiques impliqués dans le recyclage du fer lors de l'érythrophagocytose. Le passage du fer dans la circulation est régulé via le contrôle de l'expression de la ferroportine

par deux mécanismes. D'une part, l'ARNm de la ferroportine contient une séquence IRE dans sa partie 5'. Quand les entérocytes manquent de fer, les IRP se fixent à cette séquence IRE, la traduction de la ferroportine est interrompue et le fer n'est pas relargué. Quand les entérocytes contiennent suffisamment de fer, les IRP se détachent de l'IRE, la synthèse de ferroportine reprend et le fer peut être exporté³⁴⁹. D'autre part, la ferroportine subit le contrôle de l'hepcidine. L'hepcidine est une hormone majeure dans l'homéostasie du fer de découverte assez récente³⁴⁷. Ce peptide est synthétisé essentiellement par le foie sous deux formes prédominantes de 20 ou 25 acides aminés. Après sécrétion par le foie, l'hepcidine gagne le pôle baso-latéral des entérocytes et provoque l'internalisation et la dégradation de la ferroportine. La sécrétion de l'hepcidine est augmentée quand le fer sérique est trop élevé et entraîne donc la diminution d'expression de la ferroportine qui empêche l'export du fer. L'hepcidine régule l'export du fer par les macrophages et les hépatocytes par le même mécanisme^{350,351}.

L'hémojuvéline (HJV) est une protéine qui joue un rôle majeur dans le contrôle de l'expression de l'hepcidine et donc dans le maintien de l'homéostasie du fer par l'impact que l'hepcidine exerce sur le contrôle de la biodisponibilité plasmatique du fer. Exprimée sur la membrane de l'hépatocyte, elle joue le rôle de corécepteur des bone morphogenetic proteins (BMP) et participe ainsi à la transmission du signal né de l'interaction entre les BMP et leurs récepteurs^{352,353}. Cela entraîne une expression de l'hepcidine par les hépatocytes au travers de la voie de transduction du signal BMP/SMAD et des BMP-responsive éléments localisés dans le promoteur du gène codant l'hepcidine (**figure 16**). Une forme soluble de l'HJV, produite par les hépatocytes mais aussi par le muscle strié, second site d'expression de l'HJV, pourrait moduler l'efficacité biologique de la forme membranaire, par compétition avec le récepteur aux BMP.

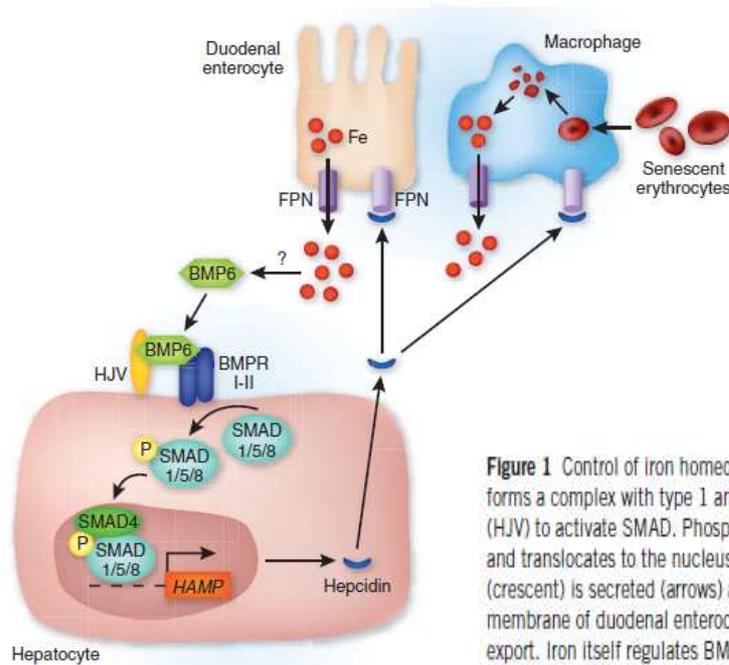


Figure 1 Control of iron homeostasis by hepcidin in mammals. BMP6 on the hepatocyte surface forms a complex with type 1 and type 2 BMP receptors (BMPR) and the co-receptor hemojuvelin (HJV) to activate SMAD. Phosphorylated (P) SMAD 1/5/8 forms heteromeric complexes with SMAD4 and translocates to the nucleus to activate the target *HAMP* gene promoter. Active hepcidin hormone (crescent) is secreted (arrows) and acts on the iron exporter ferroportin (FPN) on the basolateral membrane of duodenal enterocytes and macrophages. The interaction of hepcidin with FPN blocks iron export. Iron itself regulates BMP6, although the mechanism has not yet been characterized.

Figure 16 : Régulation de l'expression de l'hepcidine par les BMP (C. Camaschella, Nature Genetics 2009).

Dans la circulation sanguine, le fer est instantanément pris en charge par la transferrine pour éviter la production de ROS par le fer libre. La transferrine (Tf) est une glycoprotéine sérique comportant deux sites de haute affinité pour la fixation du fer³⁵⁴. La liaison de la ferro-transferrine au récepteur de la transferrine de type 1 (TfR1 ou TfR) est la première étape de capture du fer par toutes les cellules de l'organisme (**figure 17**). Le TfR est en effet une glycoprotéine transmembranaire exprimée de façon ubiquitaire par toutes les cellules nucléées. Après l'étape de fixation, le complexe ferro-transferrine/TfR est internalisé. Dans les endosomes, l'acidification par une pompe à protons entraîne le relargage par la Tf des ions Fe(III) qui sont réduits en Fe(II) par une ferriréductase appelée steap3 (six transmembrane epithelial antigen of the prostate 3)³⁵⁵. Grâce au transporteur DMT1, le Fe(II) passe dans le cytoplasme où il rejoint le pool de fer labile. Il peut alors être soit stocké par liaison à la ferritine, soit consommé. Une étape d'exocytose permet le recyclage du TfR à la membrane et la libération de l'apo-transferrine prête à prendre en charge à nouveau du fer. En plus de lier la transferrine, le TfR peut lier les immunoglobulines de classe A (IgA) et son interaction avec les IgA polymériques modulerait la sensibilité des érythroblastes à l'Epo dans des situations physiologiques et pathologiques (travail de thèse de S. Coulon, **ANNEXE 3**).

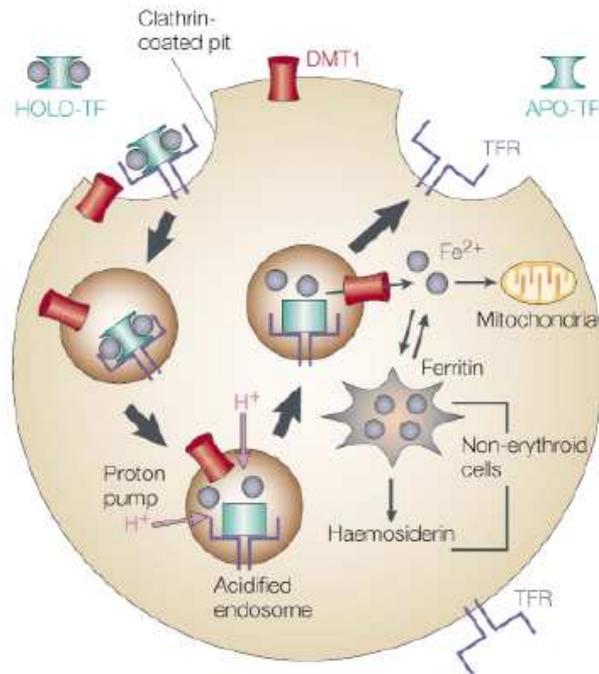


Figure 17 : Le cycle de la transferrine (N.C. Andrews, Nature Reviews Genetics, 2000).

La capture du fer est régulée par le niveau d'expression cellulaire du TfR soumise au contrôle du système IRE/IRP. Les ARNm du TfR comportent une séquence IRE à leur extrémité 3' et sont donc stabilisés quand les cellules sont déficientes en fer. De plus, la fixation de la protéine HFE sur le TfR provoque un encombrement stérique empêchant la fixation de la ferro-transferrine. Les mutations qui touchent HFE sont responsables de l'hémochromatose, maladie de surcharge en fer^{356,357}. Un autre récepteur de la transferrine a été décrit il y a une dizaine d'années, le TfR2³⁵⁸. Ses fonctions n'ont pas toutes été élucidées mais son rôle dans l'homéostasie du fer semble crucial : les souris ko pour le TfR2 ont une surcharge en fer et des mutations de TfR2 ont été identifiées dans une forme d'hémochromatose^{359,360}.

3.2. Le métabolisme du fer dans les cellules cancéreuses

L'anomalie touchant le métabolisme du fer la plus connue dans les cellules cancéreuses est la surexpression du TfR1³⁶¹. Dès les années 1980, les travaux utilisant des anticorps bloquant le TfR1 ont montré un ralentissement de la croissance tumorale et ont permis de faire le lien entre cette surexpression et la prolifération accrue des cellules cancéreuses³⁶²⁻³⁶⁴. Par la

suite, d'autres études ont mis en évidence le rôle indispensable du fer pour la synthèse de l'ADN et la surexpression du TfR est apparue comme le reflet logique de l'index mitotique élevé propre aux cellules tumorales³⁶⁵. L'expression du TfR est indispensable pour la capture du fer. D'ailleurs, chez la souris, le ko du TfR est létal au stade embryonnaire par défaut de développement neurologique et absence d'érythropoïèse³⁶⁶. Il semble pourtant que les cellules tumorales ont la capacité de capturer la ferro-transferrine sans passer par le TfR. Des expériences de saturation du TfR1 sur les cellules de mélanome et d'hépatome ont permis d'intensifier ce mécanisme qui correspond en fait à une pinocytose³⁶⁷⁻³⁶⁹.

L'expression du TfR1 est normalement régulée par le système IRE/IRP déjà décrit. Il est intéressant de noter que le proto-oncogène c-Myc est capable d'augmenter l'expression du TfR1, mais aussi de DMT1 et d'IRP2 et de diminuer celle de la chaîne lourde de la ferritine. L'expression de c-Myc est elle-même dérégulée dans de nombreuses tumeurs et peut donc tout à fait contribuer à un dérèglement de l'homéostasie du fer favorisant la tumorigénèse³⁷⁰. D'autres études ont montré une association entre la progression des cancers colorectaux et l'augmentation de l'expression des protéines nécessaires à la capture du fer tels que le TfR, DMT1 et Dcytb tandis que les protéines vouées à l'export du fer, la ferroportine et l'hephaestine sont moins exprimées³⁷¹. De plus, l'expression forcée du TfR1 dans les cellules tumorales leur confère un avantage prolifératif alors que son extinction diminue la prolifération cellulaire et altère l'expression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire tel que GADD45³⁷⁰. Très récemment, une étude a montré que dans le cancer du sein, l'expression du TfR est un marqueur de mauvais pronostic et peut prédire la résistance au tamoxifène³⁷². L'ensemble de ces observations a fait du TfR1 une cible thérapeutique très attractive sous réserve d'une certaine non-spécificité et donc d'une toxicité certaine pour toutes les cellules en division. Nous reviendrons par la suite sur les nombreuses études utilisant cette approche thérapeutique.

De nombreuses lignées et cellules tumorales expriment le TfR2. La transfection des cellules CHO (Chinese hamster ovary) avec le TfR2 les rend moins sensibles aux effets antiprolifératifs de la deferoxamine, un chélateur de fer. En outre, les tumeurs exprimant le TfR1 et TfR2 ont une croissance plus importante chez la souris nude que les tumeurs n'exprimant que le TfR1. Ce récepteur constitue donc pour les cellules tumorales un moyen supplémentaire de capturer le fer et leur confère un avantage prolifératif³⁷³. Dans le même ordre d'idée, Les cellules de mélanome expriment la mélanotransferrine, capable de se lier au fer exactement comme le fait la transferrine. Cette molécule est impliquée dans la prolifération, la migration et l'invasion des cellules mélanomateuses *in vitro* et dans la croissance tumorale *in vivo*³⁷⁴.

La ferritine subit également des modifications dans les cellules cancéreuses. Dans les neuroblastomes, le taux de ferritine sérique est élevé dans les stades III et IV mais pas dans les stades I et II. Ainsi, on utilise ce taux comme un facteur pronostique, un taux élevé étant

associé à un mauvais pronostic³⁷⁵. Dans de nombreuses autres tumeurs, le taux de ferritine sérique est élevé alors même que le stockage du fer n'est pas augmenté^{376,377}. Deux équipes, l'une travaillant sur une lignée leucémique, l'autre sur une lignée de cancer du poumon, ont rapporté que ces cellules tumorales sécrétaient une molécule immunologiquement proche de la ferritine. Le traitement des cellules par un anticorps anti-ferritine a inhibé la croissance cellulaire indiquant clairement que cette molécule est en fait un facteur de croissance autocrine^{378,379}. D'autres études ont mis en évidence l'expression de site de fixation de la ferritine par plusieurs types de tumeurs et la possibilité de capturer la ferro-ferritine par endocytose avec le récepteur³⁸⁰. Le rôle de la ferritine sécrétée comme facteur de croissance tumoral reste toutefois encore à démontrer.

Un des rôles majeurs du fer dans les cellules normales et *a fortiori* dans les cellules tumorales hautement prolifératives est son implication essentielle dans la synthèse de l'ADN. L'enzyme clé de la synthèse de l'ADN est la ribonucléotide réductase (RR), constituée de 2 sous-unités, R1 et R2. Le site actif de l'enzyme se situe sur la sous-unité R1 mais une série d'interactions entre les résidus cystéines de R1 et les radicaux tyrosyl de R2 sont nécessaires à son activité catalytique. Le fer se lie à R2 et, en réagissant avec l'oxygène, permet la transformation des résidus tyrosine de R2 en radicaux tyrosyl et leur transfert à la sous-unité R1 et est donc indispensable à l'activation de l'enzyme³⁶⁵. Une autre sous-unité R2 a été décrite, la p53R2. La RR utilisant cette sous-unité spécifique est activée en réponse à p53 pour réparer les dommages de l'ADN³⁸¹. Les cellules mutées pour p53 peuvent néanmoins exprimer cette sous-unité car elle peut être aussi activée par les analogues de p53 tel que p73. Ainsi, l'inhibition de la RR se traduit par l'arrêt de la synthèse d'ADN et de la prolifération cellulaire, et l'inhibition de P53R2, empêche la réparation de l'ADN conduisant à un arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose³⁸². L'activité de ces deux enzymes est augmentée dans les cellules tumorales, et toutes deux ont besoin de fer pour être activées.

Le fer est aussi impliqué dans la progression dans le cycle cellulaire en modulant l'expression de plusieurs molécules du contrôle du cycle. La privation en fer modifie ainsi l'expression de p53, de GADD45, des cyclines D1, D2 et D3, de P21 et de CDK2³⁸³. L'effet de la privation en fer sur p21 est assez paradoxal puisqu'elle augmente le taux d'ARNm mais diminue l'expression de la protéine. Le promoteur de p21 comporterait des séquences régulatrices sensibles aux réactions redox expliquant l'augmentation du transcrit, mais la privation en fer séquestrerait les ARNm dans le noyau et provoquerait leur dégradation au niveau du protéasome expliquant la diminution de la protéine³⁸⁴. Il en découle l'arrêt du cycle cellulaire à la transition G1/S et l'induction de l'apoptose. L'ensemble de ces informations indique que le ciblage du métabolisme du fer est une approche thérapeutique anti-tumorale qui mérite d'être développée.

3.3. Propriétés antitumorales des chélateurs de fer

Une approche de ciblage de l'homéostasie du fer peut être l'administration de chélateurs de fer. Les plus utilisés en thérapeutique sont la deferoxamine et le deferasirox. Initialement, ces chélateurs ont obtenu l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la surcharge en fer dans les hémochromatoses primaires et secondaires, et les thalassémies. Cependant, différentes études récentes ont mis en évidence une activité anti-tumorale potentielle de ces chélateurs *in vitro* et *in vivo*. Nous verrons que les chélateurs d'autres classes chimiques possèdent aussi ces propriétés.

- Deferoxamine :

La deferoxamine (DFO) est un sidérophore hexadentate dont les propriétés anti-prolifératives ont été démontrées sur un large panel de cellules tumorales (**figure 18**). *In vitro*, le DFO est capable d'inhiber la prolifération de la lignée mélanomateuse SK-MEL-28³⁸⁵. De nombreuses études ont été réalisées dans le neuroblastome. *In vitro*, les cellules de neuroblastome sont dix fois plus sensibles à la privation en fer que les cellules de moelle normale³⁸⁶. La même dose de DFO induit l'apoptose de 90% des cellules de deux lignées de neuroblastome alors qu'elle a peu d'effet sur des cellules non-neuroblastomateuses. De plus, lorsque le DFO est complexé au fer, on n'observe plus d'inhibition de croissance cellulaire ce qui indique bien que l'effet antiprolifératif du DFO est directement lié à sa capacité de chélation du fer³⁸⁷. *In vivo*, une étude réalisée chez 9 patients montre une réduction de 50% de l'envahissement médullaire chez 7 patients et une réduction de 48% de la masse tumorale chez un patient³⁸⁸. Un autre essai réalisé chez 57 patients utilisant le DFO en association avec plusieurs agents de chimiothérapie (cyclophosphamide, etoposide, carboplatine et thiotepa) rapporte une réponse complète chez 24 patients, une réponse partielle chez 26 patients, 3 réponses mineures et 4 absences de réponses³⁸⁹. Cependant, le traitement par DFO de 10 enfants en rechute n'a obtenu aucune réponse et le DFO ne parvient pas à inhiber la croissance tumorale chez des souris nude xénogreffées avec des tumeurs humaines^{390,391}. Cette inconstance de réponse peut être attribuée à la faible demi-vie du DFO nécessitant son administration par perfusion sous-cutanée continue pour maintenir une concentration efficace, et à la grande hydrophilie de cette molécule expliquant qu'elle ne puisse pas être administrée par voie orale et surtout son incapacité à franchir la membrane cellulaire. Ces considérations ont conduit au développement d'autres chélateurs plus lipophiles et aux propriétés anti-tumorales augmentées.

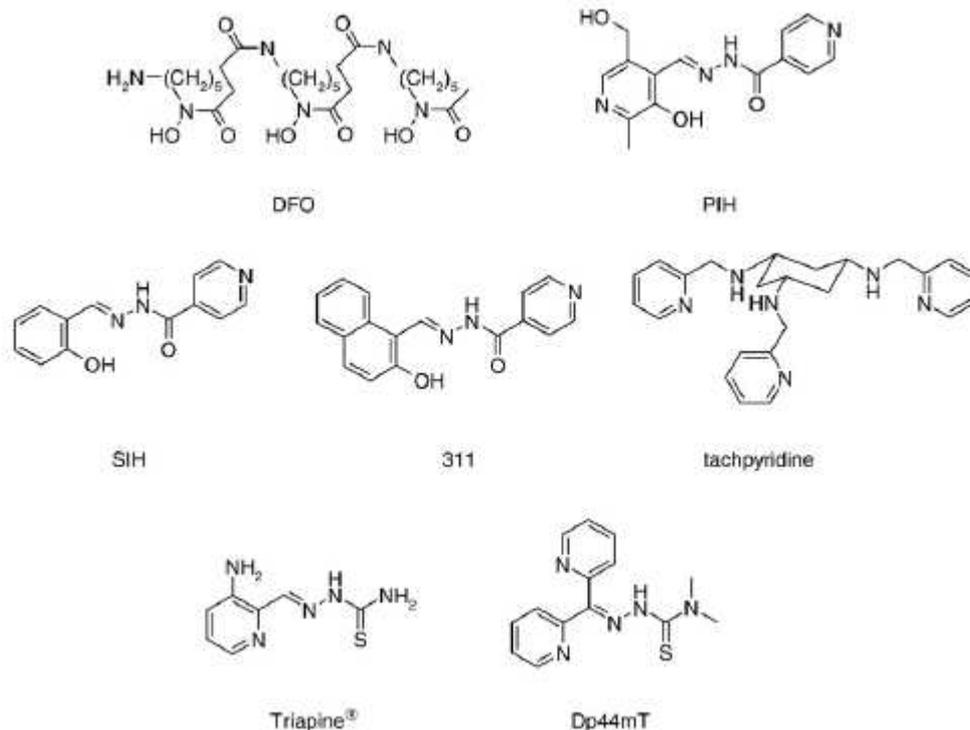


Figure 18 : structure chimique des chélateurs de fer (D.R. Richardson, *Biochimica et biophysica Acta* 2009).

- Tachpyridine :

La tachpyridine est un chélateur hexadentate de structure *cis,cis*-1,3,5-triaminocyclohexane (**figure 18**). *In vitro*, son activité cytotoxique sur les lignées de cancer de la vessie MBT et T24 est bien supérieure ($IC_{50} = 4,6 \mu M$) à celle du DFO ($IC_{50} = 70 \mu M$). Cette molécule est en outre capable de lier le Ca(II), le Mg(II), le Cu(II) et le Zn(II) en plus du Fe(II). Ses propriétés cytotoxiques dépendent de la chélation du fer puisque l'ajout de fer protège les cellules de ses effets. La tachpyridine peut chélater le Fe(III) qui est ensuite réduit en Fe(II) par oxydation du ligand. Cette réaction est critique pour la production de ROS³⁹². Enfin, la tachpyridine inhibe la synthèse de la ferritine et induit l'apoptose par un mécanisme ne dépendant pas de p53, ce qui est très intéressant dans un contexte tumoral où la délétion et les mutations de p53 sont fréquentes³⁹³.

- Deferasirox (ICL670A)

Ce chélateur tridentate a été développé assez récemment par le laboratoire pharmaceutique Novartis³⁹⁴ (**figure 19**). Il présente l'avantage d'être lipophile et de traverser les membranes cellulaires. Il peut donc chélater de manière extrêmement efficace le fer extra et intracellulaire. Contrairement au DFO, il peut être administré par voie orale, ce qui est

beaucoup moins contraignant qu'une perfusion sous-cutanée pour le traitement au long cours des surcharges en fer. Quelques travaux montrent que le deferasirox (DFX) a des propriétés anti-prolifératives *in vitro* mais à des concentrations beaucoup plus élevées que la plupart des chélateurs développés comme anticancéreux. Il faudrait ainsi atteindre la concentration de 20 μ M pour observer l'inhibition de la synthèse de l'ADN. Cette molécule d'apparition récente est donc essentiellement utilisée pour ses propriétés chélatrices très efficaces. Son activité anti-tumorale est encore assez peu étudiée mais les résultats obtenus sur les hépatomes humains et de rat semblent prometteurs^{395,396}.

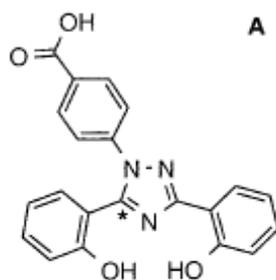


Figure 19 : Structure chimique du deferasirox (d'après Bruin et al. Drug metabolism and disposition 2008).

- Aroylhydrazones :

Le chef de file de cette classe est la pyridoxal isonicotinoylhydrazone (PIH) dont les propriétés chélatrices ont été démontrées par Ponka dès 1979 en utilisant des réticulocytes marqués au ⁵⁹Fe (**figure 18**)³⁹⁷. L'efficacité de ce chélateur a été démontrée dans de nombreux autres modèles cellulaires et est bien supérieure à celle du DFO^{398,399}. Ces deux molécules ont toutefois quasiment la même habilité à inhiber la synthèse de l'ADN dans les cellules de neuroépithéliomes⁴⁰⁰. Cette observation suggère qu'il n'y a pas de corrélation entre l'efficacité de chélation et celle d'inhibition de la synthèse d'ADN et implique donc que les effets anti-tumoraux des chélateurs sont probablement dépendants de leur capacité à chélater différents pools du fer cellulaire. Plusieurs analogues de la PIH ont par la suite été développés à partir d'un noyau pyridoxal (série des « 100 »), d'un noyau salicyaldéhyde (série des « 200 ») ou d'un noyau 2-OH-1-naphtylaldéhyde (série des « 300 »). Il a alors été possible d'établir une relation structure activité, la série des 300 étant la plus anti-proliférative et la série des 200 la plus chélatrice⁴⁰¹. Parmi la série des 300, la molécule 311 est la plus active parce qu'elle chélate le pool de fer nécessaire à l'activation de la RR, ce qui conduit à la mort cellulaire. De plus, elle diminue l'expression de nombreuses protéines du

cycle cellulaire telles que CDK2 et les cyclines A, B1, D1, D2 et D3⁴⁰². Parallèlement, le 311 augmente l'expression des gènes p21/WAF1 et GADD45, témoins de dommages à l'ADN dont l'expression est augmentée par p53, et celle de Ndrp-1, codant une protéine anti-métastatique de description récente⁴⁰³. D'autres analogues de la PIH ont été développés, les PKIH (di-2-pyridylketone isonicotinoylhydrazone). Ils présentent la particularité de conserver leurs propriétés anti-prolifératives même complexés avec le Fe(II). Les complexes Fe(II)-PKIH ont en effet une activité redox leur permettant de dégrader l'ADN en présence de Fe(II) et de H₂O₂. De ce fait, comme le 311, ils entraînent l'up-régulation de p21/WAF1 et de GADD45⁴⁰⁴.

- Thiosemicarbazones :

Ces chélateurs tridentate sont les plus anciens dont on ait décrit les propriétés anti-tumorales (**figure 18**)⁴⁰⁵. Ils chélatent le Fe(II) mais aussi le Cu(II), le Co(II), le Ga(II), le Mn(II) et le Zn(II). Leur activité anti-proliférative démontrée essentiellement avec la 3-aminopyridine-2-carboxaldéhyde thiosemicarbazone (Triapine®) est liée à l'inhibition directe et indirecte de la RR⁴⁰⁶. La Triapine® possède une activité redox et lorsqu'elle se lie au Fe(III), la réaction de réduction en Fe(II) produit des ROS. Ces ROS sont capables d'éteindre les radicaux tyrosyl de la sous-unité R2 de la RR, ce qui provoque l'inactivation de cette dernière. Dans cette étude, il a même été montré que la Triapine® complexée au fer est plus efficace que la Triapine® libre pour inhiber la RR⁴⁰⁷. Cette molécule agit toutefois aussi sur la RR par déplétion directe des stocks de fer intracellulaire⁴⁰⁸. Les effets de la Triapine® ont été très bien caractérisés dans plusieurs études *in vitro* et *in vivo*, et depuis quelques années, cette molécule fait l'objet d'essais de phase I et II. L'administration de Triapine® chez 21 patients atteints de tumeurs solides d'origines diverses en échec de traitement a permis la diminution des marqueurs tumoraux et la stabilisation de la maladie chez 4 patients. A la dose de 120mg/m²/jour, la Triapine® était très bien tolérée mais une pancytopenie et une méthémoglobinémie est apparue chez 3 des 6 patients qui recevaient la dose de 160mg/m²/jour⁴⁰⁹. Un autre essai a montré que la Triapine® pouvait être à l'origine de méthémoglobinémies sévères chez les patients déficients en G6PD (glucose-6-phosphate déshydrogénase) du fait de leur incapacité à réduire la méthémoglobine en présence de l'activité redox de la Triapine®⁴¹⁰. Plus récemment, un essai de phase I a rapporté l'efficacité anti-leucémique de la Triapine®. Aucune rémission complète ou partielle n'a été observée, mais une diminution du taux de leucocytes supérieure à 50% est survenue chez 76% des patients. Des effets secondaires (diarrhée, dyspnée, hypoxie et méthémoglobinémie) n'ont été observés que chez un patient recevant la dose la plus forte (85mg/m² administrés deux fois par jour, 5 jours sur 7)⁴¹¹. Une étude de phase II dans le carcinome rénal métastatique a été interrompue précocement en l'absence de réponse clinique. Il faut noter toutefois que du fait de la survenue de nombreux effets secondaires, seuls 47% des patients ont reçu au moins 90% de la dose de Triapine® prévue⁴¹². Dans l'adénocarcinome pancréatique avancé, un essai de phase II a testé l'efficacité anti-tumorale

de la Triapine® en association à la gemcitabine. Parmi les 25 patients inclus, 4 ont interrompu le traitement à cause d'effets secondaires (infection myocardique, hypertension, hypoxie et vomissements) et 11 ont vu une stabilisation de leur maladie. Aucune réponse objective n'ayant été observée, cet essai a lui aussi été interrompu. D'autres essais de phase II sont encore en cours mais la plupart des résultats publiés ne sont pas très encourageants⁴¹³.

- Di-2-pyridylcétone-thiosemicarbazones (DpT):

Plusieurs chélateurs appartiennent à cette classe chimique, hybride entre la classe des PKIH et la série des 300 déjà décrites. Dès leur développement, ces chélateurs, dont le plus connu est le Dp44mT, ont été comparés au DFO et au 311, dont ils surpassent les propriétés de chélation du fer et d'inhibition de la prolifération cellulaire (**figure 20**). Ainsi l'IC50 des DpT sur les cellules de neuroépithéliome se situe entre 0,03 et 0,06 μM alors qu'elle est de 5 μM pour le DFO et de 0,3 μM pour le 311. Des résultats similaires sont obtenus avec la lignée de mélanome SK-MEL-28 et la lignée MFC7. Dans un modèle de souris greffées avec la lignée cellulaire M109 de carcinome du poumon, l'administration pendant 5 jours de Dp44mT à la dose de 0,4mg/kg, réduit la taille des tumeurs de 47%. La Triapine® administrée à la dose de 6mg/kg dans ce modèle ne réduit la taille des tumeurs que de 10% et provoque de nombreux effets secondaires (perte de poids, anémie et diminution des leucocytes)⁴¹⁴. Dans une étude plus récente, Whitnall a confirmé l'efficacité anti-tumorale *in vitro* du Dp44mT en utilisant une trentaine de lignées cellulaires pour lesquelles l'IC50 du Dp44mT est de $0,03 \pm 0,01 \mu\text{M}$ alors que celle de la Triapine® est de $1,41 \pm 0,37 \mu\text{M}$ et celle de DFO s'étend de 3 à plus de 25 μM selon la lignée testée. L'efficacité antitumorale du Dp44mT dans des modèles de souris nude xénogreffées par différentes lignées est démontrée dans la même étude. Il faut remarquer qu'à forte dose, le Dp44mT provoque une fibrose cardiaque dont le mécanisme n'est pas élucidé. De manière surprenante, le Dp44mT réduit la croissance tumorale alors que les tumeurs ne sont pas déplétées en fer. Certes, l'activité anti-tumorale du Dp44mT est due à sa lipophilie et à sa capacité à chélater le fer intracellulaire, mais vient aussi d'une activité redox produisant des ROS délétères. De plus, le Dp44mT est capable d'induire l'apoptose par une voie p53 indépendante et augmente l'expression du suppresseur de métastase Ndr-1⁴¹⁵.

- Benzoylpyridine thiosemicarbazones (BpT) :

Ces chélateurs ont été développés dans le laboratoire de D.R. Richardson par modification chimique de la série des DpT de manière à augmenter leur lipophilie, leur capacité de liaison au fer et donc leur activité anti-proliférative (**figure 20**). Les BpT ont des propriétés anti-prolifératives supérieures aux chélateurs DpT dont ils dérivent : leur IC50 varie de 0,002 à 0,005 μM sur la lignée de neuroépithéliome SK-N-MC. Ils sont moins efficaces que les DpT pour chélater le fer intracellulaire mais ont une activité redox supérieure, ce qui renforce l'importance de cette fonction pour le potentiel anti-tumoral des chélateurs⁴¹⁶. Au cours

d'une étude préliminaire, un chélateur de classe BpT a montré une bonne activité anti-tumorale dans un modèle de souris nude xéno greffées avec la lignée DMS-53 de cancer du poumon. Cette molécule est bien tolérée et n'a pas provoqué de fibrose cardiaque (résultats non publiés de Yu et Richardson).

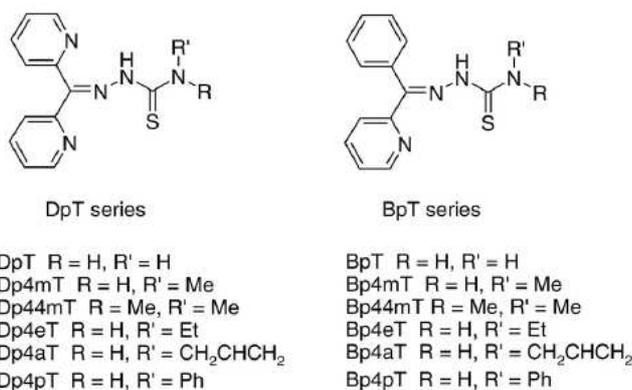


Figure 20 : structure chimique des chélateurs de la série DpT et BpT (D.R. Richardson, Biochimica et Biophysica Acta 2009).

- Thiohydrazones :

Les études de structure-activité des chélateurs indiquent que la propriété redox des molécules est responsable de leur activité anti-proliférative. L'équipe de Richardson a remarqué que les chélateurs de type PKIH ont un site donneur d'électrons de type N,N,O et sont de mauvais inhibiteurs de la prolifération alors que les chélateurs de type DpT ont un site donneur de type N,N,S est sont de très bons inhibiteurs de la prolifération^{417,418}. Cette équipe a donc développé une nouvelle classe de chélateurs, les thiohydrazones, en remplaçant un atome d'oxygène par un atome de soufre dans la structure des aroylhydrazones. Les thiohydrazones de type O,N,S tels que le PTBH (pyridoxal thiobenzoylhydrazone), le STBH (salicylaldéhyde thiobenzoyl hydrazone) et le NTBH (2-OH-1-naphtaldéhyde thiobenzoyl hydrazone) ont une faible activité redox. Leurs propriétés anti-prolifératives sont inférieures à celles de leur molécules-mères, les O,N,O aroylhydrazones. Les thiohydrazones de type N,N,S tels que le PKTBH (di-2-dipyridylcétone thiobenzoylhydrazone) et le BPTBH (2-benzoylpyridyne thobenzoyl hydrazone) ont une meilleure activité anti-tumorale que leurs molécules-mères, les N,N,O aroylhydrazones (**figure 21**). Leur activité redox augmentée les rend aussi efficaces que les DpT et les BpT⁴¹⁹.

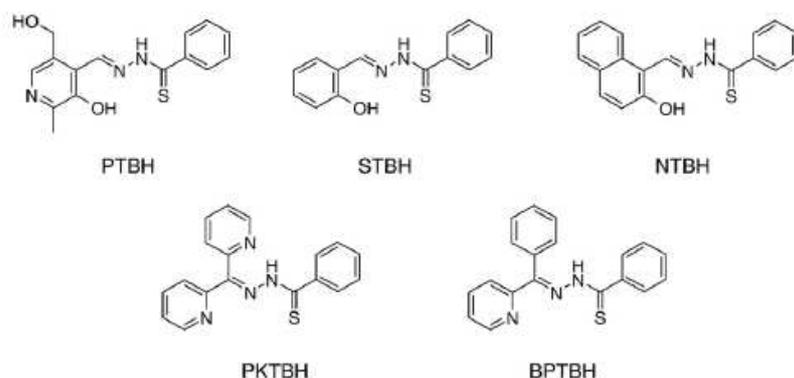


Figure 21 : Structure chimique des chélateurs de la famille des thiohydrazones (D.R. Richardson, Biochimica et Biophysica Acta 2009).

Les chélateurs de fer possèdent des propriétés anti-tumorales évidentes qui sont dues à leur capacité à diminuer le fer intracellulaire mais aussi, et surtout, à leurs propriétés redox. Leur cible privilégiée est la ribonucléotide réductase, dont l'inhibition empêche la synthèse de l'ADN et provoque la mort cellulaire. Cette approche anticancéreuse simple demeure sous-exploitée car les études précliniques et cliniques utilisant des chélateurs efficaces sont trop rares et se sont souvent heurtées à des problèmes de toxicité.

3.4. Les autres moyens de cibler l'homéostasie du fer

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. Les cellules tumorales à haute capacité proliférative ont des besoins accrus en fer et expriment donc plus fortement le RTf pour internaliser davantage de ferro-transferrine. C'est pourquoi le RTf et la transferrine constituent des cibles attractives en thérapie anti-tumorale ciblée⁴²⁰ (**figure 22**).

La transferrine peut être utilisée comme véhicule pour faire pénétrer des molécules de chimiothérapie, des toxines ou même des virus à l'intérieur des cellules tumorales. Comme indiqué dans la première partie, la doxorubicine est une drogue majeure dans le traitement des LAM, mais aussi dans de nombreux autres cancers. Son utilisation pose des problèmes de cardiotoxicité, de myélosuppression et de toxicité rénale qui sont tous attribuables à sa diffusion systémique. Dans un certains nombres de cas, les cellules tumorales peuvent également devenir résistantes à cette drogue. Le couplage chimique de la doxorubicine à la transferrine permet sa distribution ciblée aux cellules tumorales exprimant le TfR à un haut

niveau. La toxicité de ce conjugué est de 3 à 10 fois supérieure à celle de la doxorubicine seule selon le type de cellules tumorales étudié (HL60, HeLa, K562) ou est similaire à celle de la doxorubicine seule (U937, MDA-MB-468, une lignée de cancer du sein)⁴²¹⁻⁴²⁵. Comme la transferrine, le conjugué est endocyté, il interfère avec la capture du fer et le recyclage du récepteur et sa cytotoxicité serait variable du fait d'une étape pH-dépendante. Certaines cellules tumorales sont résistantes à la doxorubicine car la drogue est séquestrée dans des vésicules cytoplasmiques. Le conjugué permet de contourner ce mécanisme de résistance dans les cellules MCF7 et KB (carcinome oropharyngé) en relocalisant la drogue au niveau du noyau où elle agit en s'intercalant dans l'ADN⁴²⁶. Son association au nitrate de Gallium (GN) renforce encore sa toxicité dans la mesure où le GN se lie à la transferrine à la place du fer, ce qui provoque en plus la privation en fer des cellules et l'inhibition de la RR. Le complexe GN-Tf-doxorubicine n'est pas plus cytotoxique que la doxorubicine sur les cellules qui sont sensibles. En revanche, il diminue de 100 fois l'IC50 de cette drogue sur les cellules résistantes qui redeviennent donc sensibles. Il semblerait enfin que le conjugué exerce des effets cytotoxiques membranaires, et donc indépendants de la doxorubicine, en inhibant les NAPDH deshydrogénase et oxydase localisées au niveau de la membrane plasmique^{427,428}.

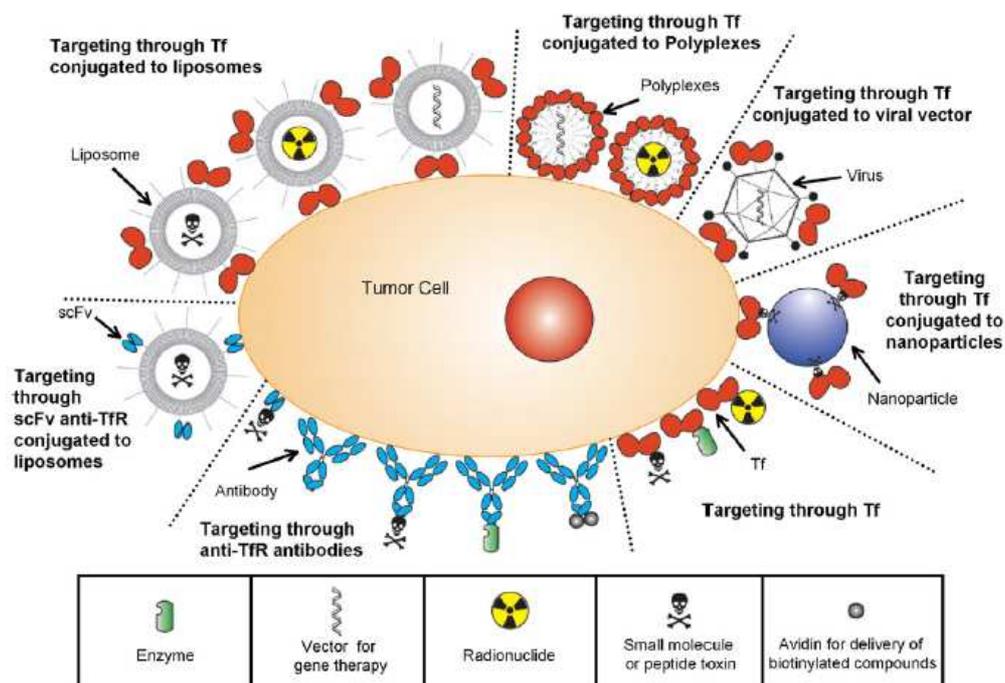


Figure 2 Strategies used to target the TfR and deliver therapeutic agents to malignant cells. The TfR can be targeted by direct interaction with conjugates of its ligand Tf as well as by monoclonal antibodies or single chain antibody fragments targeting the extracellular domain of the TfR. Targeting the TfR has been utilized to deliver chemotherapeutic drugs, protein toxins, radionuclides, liposomes, modified viral particles, and nanoparticles.

Figure 22 : les différentes stratégies antitumorales ciblant le récepteur de la transferrine (T.R. daniels *et al.* Clinical immunology 2006).

La transferrine a été couplée à d'autres molécules de chimiothérapie tels que le cisplatine, le chlorambucil, la mytomycine C ou la gemcitabine. Le conjugué Tf-cisplatine a montré une grande efficacité antitumorale *in vitro* sur plusieurs lignées cellulaires et *in vivo* dans des modèles de mélanome murin et de carcinome mammaire chez le rat^{429,430}. Sa sécurité d'utilisation a été démontrée dans un essai de phase I chez des patients atteints de cancer du sein avancé avec un taux de réponse de 36% (4 patients sur 11). Dans un autre essai dans la même pathologie, un traitement alternant chélateur de fer et Tf-cisplatine a permis d'obtenir 87% de réponses partielles (7 patients sur 8)⁴³¹. Le conjugué Tf-chlorambucil a montré des propriétés cytotoxiques supérieures au chlorambucil seul sur les lignées MFC7 et MOLT-4. Son administration à des souris n'a pas engendré de toxicité et a permis leur survie tandis que les souris traitées par la drogue seule sont toutes mortes⁴³². Le couplage d'un autre alkylant, la mitomycine C, à la transferrine augmente ses propriétés antiprolifératives sur la lignée HL60 mais n'a pas plus d'effet sur la lignée HepG2 (carcinome hépatique). Aucune toxicité n'est observée quand des hépatocytes sains sont exposés à ce conjugué⁴³³. Enfin, le conjugué Tf-gemcitabine (antimétabolite) est 6 fois plus toxique que la drogue seule sur des lignées de cancer de la vessie. Il provoque la rémission partielle lorsqu'il est administré à des souris xéno greffées avec ces mêmes lignées⁴³⁴.

Plusieurs équipes ont travaillé sur le couplage de la transferrine à des toxines issues de plantes ou de bactéries. La ricine est une toxine extraite des graines de *Ricinus communis* composée de deux chaînes liées par un pont disulfure. La chaîne A est responsable de l'activité toxique en bloquant l'activité ribosomale alors que la chaîne B permet la liaison à la surface cellulaire. Le couplage de la chaîne A de la ricine à la transferrine augmente de 10 000 fois les propriétés toxiques de la chaîne A seule⁴³⁵. Ce conjugué a démontré des propriétés anti-tumorales sur les lignées MFC7 et de glioblastome de rat⁴³⁶. La chaîne A de la ricine a surtout été conjuguée à des anticorps anti-TfR augmentant leurs propriétés cytotoxiques mais, nous le verrons plus loin, posant aussi des problèmes de toxicité. La toxine diphtérique, sécrétée par *Corynebacterium diphtheria*, bloque la synthèse protéique en inhibant le facteur d'élongation E2F. Couplée à la transferrine, elle exerce des propriétés anti-tumorales sur les lignées cellulaires de médulloblastome, de glioblastome, de neuroblastome, de leucémies, de cancer de l'ovaire et du sein, et sur les cellules primaires issues de patients atteints de médulloblastome^{437,438}. L'administration de ce conjugué par voie intra-tumorale à des souris nude greffées avec des cellules de gliome entraîne la régression complète de la tumeur chez 60% des souris en 30 jours sans provoquer de perte de poids⁴³⁹. Ce conjugué a été administré dans un essai de phase I à 18 patients atteints de tumeurs cérébrales réfractaires (10 glioblastomes, 5 astrocytomes anaplasiques, 1 oligodendrogliome et 2 métastases de cancer du poumon). Une régression totale de la tumeur a eu lieu chez 2 patients et une diminution de 50% du volume tumoral a été observée chez 9 patients. Aucune toxicité locale ou systémique n'a été rapportée⁴⁴⁰. Le

succès de cet essai a permis la réalisation d'un essai de phase II dans le traitement des glioblastomes récurrents ou réfractaires. 44 patients ont été inclus, 31 d'entre eux recevant deux perfusions de conjugué Tf-toxine diphtérique, les 13 autres ne recevant qu'une seule perfusion. Un an après le traitement, 5 des 34 patients ayant reçu deux perfusions sont en rémission complète, 7 sont en rémission partielle et 9 ont vu la stabilisation de leur pathologie. Les 13 autres patients sont en progression. 14 patients ont développé un œdème cérébral traité par perfusion de mannitol⁴⁴¹. Un essai de phase III comparant le conjugué Tf-toxine diphtérique à la chimiothérapie standard dans les glioblastomes récurrents ou en progression et non opérables a débuté en 2004 mais a été suspendu faute d'efficacité.

Le couplage de la transferrine à des polymères tel que le polyéthylèneimine a permis la distribution ciblée du composé radioactif Rhenium-188 aux cellules de lymphome de Burkitt xénogreffées chez des souris Nude entraînant la nécrose des tumeurs sans diffusion aux tissus sains voisins⁴⁴². Conjuguée à des liposomes, la transferrine permet la distribution ciblée de leur contenu (gènes, chimiothérapie ou autres agents thérapeutiques) aux cellules tumorales. Ainsi, l'introduction d'oligonucléotides antisens ciblant BCL2 grâce aux liposomes couplés à la Tf dans les cellules K562 rétablit leur sensibilité à la daunorubicine⁴⁴³. Avec ce système, la réintroduction du gène p53 bloque la croissance tumorale de la lignée d'ostéosarcome HOSM-1 xénogreffée à des souris Nude⁴⁴⁴. Après modification de leur capsid, les adénovirus peuvent être couplés à la Tf et transduire toutes les cellules qui expriment le TfR. Une équipe a montré qu'un adénovirus modifié dont la capsid porte de la transferrine est capable de transduire très efficacement les cellules de la lignée OVCAR3 de cancer de l'ovaire avec un gène rapporteur⁴⁴⁵. Enfin, la transferrine a également été couplée à des nanoparticules. Ces systèmes colloïdaux submicroniques permettent la délivrance systémique de drogues cytotoxiques sans toxicité. Le paclitaxel est une chimiothérapie couramment utilisée dans le traitement des cancers de l'ovaire, du sein, de la prostate et du poumon mais est responsable de nombreux effets indésirables systémiques hématopoïétiques et neurotoxiques. Chez des souris Nude xénogreffées avec la lignée PC3 de cancer de la prostate, l'injection intratumorale de nanoparticules de paclitaxel couplées à la Tf induit la régression totale des tumeurs et une augmentation de survie comparée à celle des souris traitées par les nanoparticules de paclitaxel ou par le paclitaxel seul⁴⁴⁶.

Les études de couplage de la transferrine sont très nombreuses mais la plupart d'entre elles se limitent à la description d'effets in vitro, parfois in vivo chez la souris. Les essais utilisant de la transferrine conjuguée chez l'homme sont rares et la plupart rapportent une efficacité bien inférieure à celle observée dans les études pré-cliniques. Ces essais sont en outre confrontés à des problèmes de toxicité, si bien que cette approche très encourageante dans les années 1990 a peu progressé au cours des dix dernières années.

Le ciblage du TfR est une approche thérapeutique à laquelle s'intéressent les scientifiques depuis le début des années 1980. De nombreux anticorps ont été développés, certains se sont montrés efficaces au cours des études précliniques mais aucun d'entre eux ne figure aujourd'hui dans l'arsenal thérapeutique anticancéreux.

Les premières études de ciblage du TfR ont été faites avec des anticorps de rat dirigés contre le TfR murin. Ces anticorps présentent l'avantage de pouvoir être utilisés sur les lignées murines et testés dans les modèles de cancers murins déjà bien établis. Leurs propriétés antiprolifératives *in vitro* ont été démontrées sur de nombreuses lignées, la plupart d'origine hématopoïétique^{447,448}. Les anticorps anti-TfR n'empêchent pas l'internalisation du récepteur. Ils bloquent la prolifération des cellules en s'opposant à la capture du fer et n'ont pas tous la même efficacité, dépendante vraisemblablement de leur isotype. En effet, l'activité des anti-TfR dépend de leur capacité à réaliser un pontage entre deux TfR (cross-linking) et de ce fait les IgM sont beaucoup plus efficaces que les IgG pour bloquer les récepteurs et inhiber la prolifération cellulaire⁴⁴⁹. Les modèles animaux confirment les propriétés antitumorales des anticorps, notamment dans les leucémies et les lymphomes où ils agissent même en synergie avec le DFO pour prévenir le développement tumoral. Malheureusement ces anticorps ne sont pas capables d'inhiber la croissance de ces mêmes tumeurs lorsqu'elles sont pré-établies⁴⁵⁰.

Les expériences réalisées sur les cellules hématopoïétiques humaines normales et cancéreuses utilisent dans leur grande majorité des anticorps murins⁴⁵¹. Comme les anticorps de rat dirigés contre le TfR murin, les anticorps murins ciblant le TfR humain ne bloquent pas l'internalisation du récepteur et leurs propriétés antiprolifératives dépendent de leur isotype, les IgM étant plus efficaces que les IgG. Les études avec les anticorps dirigés contre le TfR humain confirment la nécessité de la dimérisation du récepteur pour induire l'apoptose et montrent que les cellules leucémiques sont plus sensibles que les progéniteurs sains^{452,453}. Il apparaît en outre une hétérogénéité de sensibilité aux anticorps anti-TfR parmi toutes les lignées hématopoïétiques sans que la raison en soit élucidée : l'IgG anti-TfR B3/25 inhibe la croissance des CFU-GM de volontaires sains, de patients atteints de LMC, des lignées myéloïdes KG-1 et HL60, mais pas celle de la lignée leucémique lymphoïde T CEM⁴⁵⁴. L'IgG1 anti-TfR 128.1 n'inhibe pas la prolifération des lignées lymphoïde CEM et myéloïde K562⁴⁵⁵. De manière générale, les IgG anti-TfR ne sont cytotoxiques que lorsqu'ils sont utilisés en association entre eux ou avec un autre anticorps murin favorisant leur pontage. Une autre possibilité est de les utiliser comme vecteur et de mettre à profit leur internalisation avec le TfR pour introduire des agents cytotoxiques dans les cellules tumorales. Ainsi, l'anticorps B3/25 couplé à la toxine diphtérique ou à la ricine devient capable d'induire l'apoptose de la lignée CEM. Paradoxalement, dans un modèle *in vivo* de souris nude xénotreffées avec la lignée HeLa, l'anticorps B3/25 inhibe la croissance tumorale qu'il soit seul ou couplé à la toxine diphtérique. Les auteurs émettent l'hypothèse d'une instabilité *in vivo* du conjugué ou d'une différence de clairance⁴⁴⁷. Après avoir montré des

propriétés anti-tumorales *in vitro* et dans des modèles murins *in vivo*, l'anticorps anti-TfR 45A12 couplé à la ricine a été administré par voie intraventriculaire à des patients atteints de néoplasie méningée. Malgré l'obtention d'une concentration de conjugué satisfaisante dans le liquide céphalo-rachidien, la clairance des cellules tumorales n'a été observée chez aucun patient et de nombreux effets indésirables sont survenus (maux de tête, vomissements, altération de la vigilance)⁴⁵⁶.

L'anticorps 42/6 a montré des propriétés antitumorales particulièrement intéressantes. Cet anticorps est une IgA qui prive les cellules en fer par un mécanisme non compétitif bloquant l'accès de la transferrine à son récepteur⁴⁵⁴. Il a été testé sur des lymphocytes T normaux et sur des lignées leucémiques lymphoïdes et myéloïdes dont il bloque la prolifération. Cette inhibition est réversible 48h après que l'on a retiré l'anticorps du milieu de culture⁴⁵¹. Les CFU-GM de patients atteints de leucémie myéloïde chronique sont plus sensibles que les CFU-GM de volontaires sains. Ces premiers résultats *in vitro* ont encouragé le développement d'un essai clinique où l'anticorps 42/6 a été administré chez 27 patients atteints de divers cancers réfractaires à tout traitement. Les perfusions intraveineuse de 42/6 n'ont provoqué que très peu d'effets secondaires et ont aussi eu une efficacité antitumorale partielle mais chez trois patients seulement. Cet échec a été attribué d'une part à une clairance trop rapide de ces IgA en circulation et d'autre part au développement d'une réponse immunitaire contre ces IgA de souris⁴⁵⁷.

Les anticorps anti-TfR de souris présentent en effet plusieurs inconvénients : leur demi-vie est courte, ils sont immunogènes et comme leur région constante n'est pas reconnue par les effecteurs du système immunitaire humain, ils ne peuvent pas déclencher de réactions de cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC pour antibody dependent cellular cytotoxicity) ou du complément (CDC pour complement dependent cytotoxicity). La nécessité de développer des anticorps anti-TfR chimériques ou humanisés est donc très vite apparue. Ainsi, plusieurs études ont été réalisées en utilisant des anticorps anti-TfR murins chimériques avec l'avidine de poulet. Ces anticorps chimériques ont l'avantage de pouvoir interagir avec de nombreux agents biotinylés et ont montré des propriétés thérapeutiques intéressantes notamment contre les hémopathies malignes⁴⁵⁸. Une équipe a rapporté qu'un anticorps anti-TfR humain couplé à l'avidine était capable d'induire l'apoptose des cellules malignes par le mécanisme de cross-linking⁴⁵⁹. De plus, cet anticorps induit l'internalisation du TfR dans les compartiments lysosomaux exprimant LAMP-1 empêchant la capture cellulaire du fer et induit l'apoptose en activant les caspases 3, 8 et 9. Du fait de sa fusion avec l'avidine, cet anticorps est un vecteur universel pour toute molécule cytotoxique couplée à la biotine, ce qui augmente encore ses propriétés anti-tumorales. Tout récemment, cette même équipe a montré que les propriétés cytotoxiques de cet anticorps sont augmentées lors de son association à l'acide gambogique (GA)⁴⁶⁰. Cette xanthone issue de *Garcinia hanburyi* utilisée en Médecine traditionnelle orientale est un ligand du TfR qui bloque son internalisation. Ses propriétés cytotoxiques sont dues à la privation en fer qu'elle

provoque, mais découlent aussi de la production de ROS pro-apoptotiques. La combinaison anti-TfR et GA induit l'apoptose de nombreuses lignées de leucémies, de lymphomes et de myélome, renforçant l'idée que le ciblage du TfR est une approche thérapeutique attractive pour les hémopathies malignes.

Notre équipe a caractérisé un nouvel anticorps monoclonal, A24, ciblant le RTf. A24 est une IgG_{2b,kappa} murine⁴⁶¹. Dans un premier temps, nous avons étudié les effets d'A24 dans la leucémie/ lymphome T de l'adulte liée au virus HTLV1 (ATLL)⁴⁶². Nous avons montré qu'A24 est capable d'inhiber la prolifération de ces cellules tumorales mais pas des cellules normales. De fait, A24 et la transferrine rentrent en compétition au niveau de leur fixation sur le RTf. Dans des conditions physiologiques, les cellules quiescentes présentent un nombre restreint de molécules de RTf à leur surface. Dans ces conditions, 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, dans des cellules malignes, exprimant une forte densité de récepteur, A24 se fixe de manière bivalente sur le RTf. 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. Nous avons également montré que la fixation d'A24 sur le RTf induit une endocytose du récepteur vers les compartiments lysosomiaux (**figure 23**). Les cellules traitées par A24 présentent ainsi une diminution drastique du nombre de récepteurs à la surface. Cette diminution atteint jusqu'à 90% des récepteurs en un temps très court (environ 5-10 minutes). En conséquence, les cellules ont une réduction très importante de leur capture du fer. Cette privation semble être le mécanisme majeur impliqué dans l'apoptose, par la dépolarisation de la membrane de la mitochondrie des cellules tumorales. L'efficacité d'A24 a également été évaluée dans les ATLL en administration séparée ou concomitante à un anticorps dirigé contre la chaîne alpha du récepteur de l'IL-2 (zenapax®). A24 a montré une activité antiproliférative plus importante que celle du zenapax® sur les formes aiguës et chronique des ATLL. En revanche, l'administration concomitante des deux produits n'a pas provoqué d'effet synergique (**ANNEXE 2**).

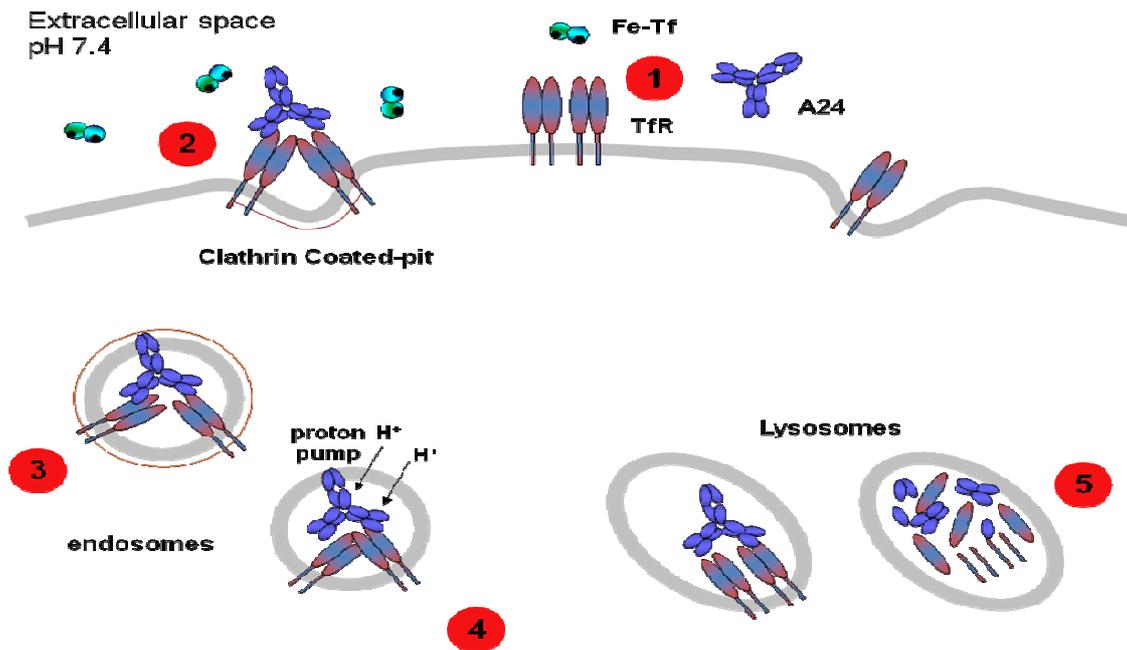


Figure 23 : Mécanisme d'action d'A24 (C. Callens *et al.* Leukemia 2008).

Plus récemment, nous avons étudié l'effet *in vivo* d'A24 dans le lymphome du manteau⁴⁶³. 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 montre 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. A24 pourrait donc être un agent thérapeutique prometteur dans les ATLL et les lymphomes du manteau, seul ou associé à d'autres anticorps monoclonaux (daclizumab, rituximab) et/ou aux chimiothérapies conventionnelles. Certes, A24 est un anticorps murin et son administration à l'homme nécessiterait une humanisation préalable. Avant de réaliser cette étape particulièrement coûteuse et délicate, nous avons administré A24 à des macaques chez lesquels il n'a été observé aucune toxicité hématologique ni atteinte des organes vitaux (données non publiées). L'administration à l'homme de l'anticorps A24 humanisé semble donc envisageable.

Ainsi le ciblage de l'homéostasie du fer semble être une approche thérapeutique très intéressante. Malgré de nombreuses études *in vitro* aux résultats très encourageants, peu de molécules ont atteint la phase des essais cliniques, qui ont donné des résultats décevants pour leur grande majorité. Les anticorps ciblant le récepteur de la transferrine et les

tranferrines modifiées se sont essentiellement heurtés à des problèmes de biodisponibilité et de toxicité occultant leur efficacité anti-tumorale. Les travaux les plus récents en oncologie se concentrent donc essentiellement sur l'utilisation des chélateurs de fer.

TRAVAIL DE THESE

1. Contexte des recherches et introduction du travail de thèse

Les leucémies aiguës sont des pathologies graves où de nouvelles thérapies ciblées sont très attendues du fait du fort taux de rechute. L'utilisation des anticorps monoclonaux dans le traitement des cancers suscite un regain d'intérêt notamment avec les exemples récents de leur efficacité dans les lymphomes et les cancers du sein. Le RTf est une cible intéressante dans les proliférations tumorales, puisqu'il est surexprimé dans la plupart des tumeurs, particulièrement au moment des rechutes. Le ciblage de l'homéostasie du fer semble être une approche attractive du fait de nos résultats préliminaires avec un anticorps anti-RTf.

Lorsque ce travail a été initié, notre laboratoire venait de démontrer les propriétés anti-prolifératives et pro-apoptotique de l'anticorps monoclonal murin A24 ciblant le récepteur de la transferrine dans deux hémopathies malignes, le lymphome du manteau et l'ATLL. De plus, il avait été montré qu'A24 agissait en privant les cellules en fer par dégradation du RTf dans les lysosomes. Du fait de la prolifération incontrôlée des blastes dans les LAM, il paraissait logique de tester l'efficacité d'A24 dans cette pathologie. Néanmoins, conscients des limites de l'utilisation d'A24 chez l'homme avant que cet anticorps ne soit humanisé, nous avons comparé les propriétés antileucémiques d'A24 à celles de deux chélateurs de fer le DFO et le DFX. Ces chélateurs avaient déjà une autorisation de mise sur le marché pour le traitement des surcharges en fer et plusieurs études avaient montré leur activité anti-tumorale essentiellement dans les tumeurs solides.

Nous avons commencé par comparer les modifications du transcriptome induites par A24, la deferoxamine (DFO) et le deferasirox (DFX) sur la lignée leucémique promyélocytaire HL60. Cette étude a révélé qu'une centaine de gènes étaient modifiés de manière commune par A24, DFO et DFX. De façon inattendue, un certain nombre de gènes normalement exprimés par les monocytes et les polynucléaires neutrophiles matures se trouvaient parmi les gènes modulés par la privation en fer. Cette observation nous a alors amenés à étudier le rôle du fer dans la différenciation myélo-monocytaire normale (dans les progéniteurs issus de sang de cordon) et pathologique (dans les cellules leucémiques) et à préciser le mécanisme de cette différenciation.

2. Manuscrit de l'article soumis sous sa forme révisée à The Journal of Experimental Medicine

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

Celine Callens^{1,*}, Séverine Coulon¹, Jerome Naudin^{1,2,3}, Isabelle Radford-Weiss⁴, Nicolas Boissel⁵, Emmanuel Raffoux⁵, Saurabh Agarwal^{2,3}, Pamela Huey Mei Wang^{2,3}, Houda Tamouza^{2,3}, Vahid Asnafi^{6,7}, Jean-Antoine Ribeil¹, Philippe Dessen⁸, Danielle Canioni⁹, Olivia Chandesris¹⁰, Marie Therese Rubio¹⁰, Carole Beaumont¹¹, Marc Benhamou^{2,3}, Hervé Dombret⁵, Elizabeth Macintyre^{6,7}, Renato C. Monteiro^{2,3}, Ivan C. Moura^{2,3} and Olivier Hermine^{1,10}

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

² INSERM, U699, Paris, France.

³ Faculté de Médecine and Université Denis Diderot Paris VII, Paris, France.

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

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

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

⁷ INSERM, EMI0210, Paris, France.

⁸ Unité de Génomique Fonctionnelle, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France,

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

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

¹¹ INSERM U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat Beaujon CRB3

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

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 or Ivan Cruz Moura, INSERM U699, Immunopathologie rénale, récepteurs et inflammation, Faculté de Médecine Xavier Bichat. 16, Rue Henri Huchard. F-75870 Paris Cedex 18 Paris, France. Phone : 33-1-5727-7301 ; FAX : 33-1-5727-7755 ; e-mail : ivan.moura@inserm.fr

ABSTRACT

Differentiating agents have been proposed to overcome the impaired cellular differentiation in acute myeloid leukemia (AML). However, this strategy has been successful only in AML3 by the combination of all-trans retinoic acid or arsenic trioxide with chemotherapy. Here we show that iron homeostasis is an effective target in the treatment of AML. Iron homeostasis-targeting therapy induced the differentiation of leukemia blasts and normal bone marrow precursors into monocytes/macrophages. The molecular mechanism involved the modulation of reactive oxygen species levels and the activation of MAPKs pathway. An analysis of gene expression patterns revealed that 30% of the most significant genes induced by iron deprivation are genes also targeted by vitamin D3 (VD), a well-known differentiating agent. Iron chelating agents induced expression of the VD receptor (VDR) and VDR phosphorylation. They act synergistically with VD signaling strikingly magnifying the activation of MAPK/JNK pathway and VDR targeted genes. This association provided the basis for a new differentiation therapy which was used in one AML patient refractory to chemotherapy. This resulted in reversal of pancytopenia, reduced blasts counts and tumor cells differentiation. We propose that iron availability modulates myeloid cell commitment. Targeting this new cellular differentiation pathway together with conventional differentiating agents provides new therapeutic modalities 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 (Lowenberg et al., 1999). There is a general consensus that the molecular events leading to AML leukemogenesis occur as a multistep process (Gilliland et al., 2004; Kelly and Gilliland, 2002). Those events 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 gene alterations/point mutations in transcription factors, or transcriptional co-activators (e.g., *CEBP α* , *NPM1*) that affect differentiation (Frohling et al., 2005; Renneville et al., 2008; Roumier et al., 2006). Transcription factors are key regulators of hematopoiesis (Graf and Enver, 2009; Sieweke and Graf, 1998). The most important ones that have been implicated in the myelomonocytic development are PU-1 for early myeloid commitment, C/EBP for granulocyte maturation and VDR and MafB for monocyte-macrophage differentiation (Friedman, 2002; Gemelli et al., 2008; Mueller et al., 2002; Sieweke and Graf, 1998).

The potential of the currently available chemotherapies to treat AML might have reached its limit (Lowenberg et al., 1999; Ravandi et al., 2007). Moreover, the majority of patients with AML are 60 years of age or older. While results of new therapeutic strategies have improved steadily in younger adults over the last 20 years, there have been less improvements in outcome among individuals older than 60 (Lowenberg et al., 2009). Based on the emerging knowledge of the biology of AML, new targeted therapeutic approaches need to be developed to interrupt proliferation, induce apoptosis and/or override the differentiation block.

The current treatment modality for the induction of a terminal differentiation program in AML has been only achieved in Acute Promyelocytic Leukemia (APL/AML3) by the use of differentiating agents combined with chemotherapy (Chen et al., 1994; Wang and Chen, 2008; Zhu et al., 2001). Most of the cases APL are characterized by the t(15;17) translocation that encodes a fusion of the promyelocytic leukemia (PML) and retinoic acid receptor alpha (RARA) proteins. The use of all-trans-retinoic acid (ATRA) with chemotherapy was a major breakthrough in APL therapy. It dramatically improved the prognosis from poor to a high cure rate (approximately 90% of patients) (Wang and Chen, 2008). The use of arsenic trioxide (ATO) since the early 1990s further improved the clinical outcome of refractory or relapsed as well as newly diagnosed APL (Wang and Chen, 2008). Current evidences are now available to show that differentiation is not the only mechanism explaining the therapeutic efficacy of ATRA or ATO in clearing APL as retinoic acid also triggers growth arrest of leukemia initiating cells (Nasr et al., 2008).

Like ATRA, vitamin D3 (VD) belongs to the steroid superfamily and plays critical role in regulating numerous cellular and physiological responses. 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) present in the promoter region of target genes, thereby inducing changes in gene transcription referred as “genomic action” (Hughes et al., 2009). VD also activates a variety of protein kinases such as the three families of mitogen-activated protein (MAP) kinases (ERK, JNK and p38), protein kinase C or Src family kinases by alternative “non-genomic” signaling pathways which are not fully characterized (Wang et al., 2003). The active metabolite of VD, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, known as calcitriol, has antiproliferative effects, can activate apoptotic pathways and inhibit angiogenesis. In the hematopoietic system, numerous experiences on AML blasts and leukemic cell lines and primary myeloid precursors showed that VD induces cell differentiation into monocytes (Abe et al., 1981; Bastie et al., 2004; Gemelli et al., 2008; Hmama et al., 1999; Hughes et al., 2009; Ji and Studzinski, 2004; Koeffler et al., 1984). Encouraging clinical trials have suggested that VD could be effective as a differentiating agent in the treatment of AML and myelodysplastic syndrome, but the hypercalcemia that occurs as a side effect of VD treatment has limited its use (Deeb et al., 2007; Ferrero et al., 2004; Srivastava and Ambrus, 2004).

Iron (Fe) 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. Iron exists in two oxidation states, the ferrous (Fe^{2+}) and the ferric (Fe^{3+}) forms. A wide range of biological functions are based on the equilibrium between these two forms. In high levels of Fe, reactive oxygen species (ROS) are generated through the Fenton reaction. In this process a small amount of free cytosolic iron generates hydroxide anions and hydroxyl radicals from hydrogen peroxide ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$) (Fenton et al., 1964). Hydroxyl radicals are highly reactive molecules which can oxidize proteins, lipids and DNA leading to cellular damages (Davies, 2005).

The transferrin receptor (CD71/TfR1) is an evolutionarily conserved receptor that is essential for the uptake of iron in mammalian cells (Daniels et al., 2006b; Lim et al., 1987; Trowbridge and Shackelford, 1986). Cancer cells overexpress TfR1 and are more sensitive to iron depletion than their normal counterparts most probably because of their high proliferative capacities (Faulk et al., 1980; Gatter et al., 1983). TfR1 is a validated target for anti-cancer therapy using both monoclonal antibodies (mAb) and drug-conjugated transferrin (Daniels et al., 2006a; Trowbridge and Domingo, 1981). We have previously characterized an anti-TfR1 antibody (A24) that exhibits potential activity as a therapeutic anti-cancer agent (Moura et al., 2001). A24 specifically binds to TfR1^{high} cells, competes with iron-loaded transferrin (Fe-Tf) for receptor binding and induces receptor endocytosis and degradation, thereby drastically impairing iron uptake (Callens et al., 2008; Lepelletier et al., 2007; Moura et al., 2004). Iron chelators have been also 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* (Le and Richardson, 2004; Richardson et al., 1994; Richardson et al., 2008; Whitnall et al., 2006).

The molecular mechanisms underlying the anti-tumor effect of iron-chelating therapeutic approaches remain to be fully elucidated (Fu and Richardson, 2007; Napier et al., 2005). We aimed to characterize these mechanisms and to validate their potential value in AML therapy. We show both *in vivo*, *in vitro* and *ex-vivo* that targeting iron homeostasis induces blasts differentiation towards the monocyte lineage by the modulation of ROS levels and the activation of MAP kinases pathway. Importantly, iron deprivation induces VDR gene expression and VDR phosphorylation providing the rational for the combination of iron chelation and VD therapies. The synergistic effect of this association amplified the activation of MAPK/JNK pathway and VDR targeted genes. 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 VD in AML therapy.

RESULTS

Targeting of iron homeostasis induces AML cell differentiation

To gain new insights in the molecular mechanisms involved in the anti-tumor activity of iron-chelating therapeutic approaches we sought to identify genes that are affected by both iron chelators (deferrioxamine (DFO) and deferasirox (DFX)) and by impairment of Fe-Tf uptake by blocking TfR1 function (using the anti-TfR1 mAb A24 (Callens et al., 2008; Lepelletier et al., 2007; Moura et al., 2004)). We hypothesized that following this strategy would decrease the probability to select 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 similarly modulated by the three iron-deprivation 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-TfR1 antibody whereas markers of granulocyte differentiation were down-regulated by the iron-deprivation agents (Figure 1b). These results were confirmed by RQ-PCR and extended to other AML cell lines from different AML subtypes (supplementary figure 1a).

We further tested the ability of iron deprivation to override the block of cell differentiation observed in AML cells. CD14 expression is undetectable on the surface of monocytic precursors and increases dramatically during their differentiation into monocytes (Kansas et al., 1990). CD11b, the α subunit of CR3 β 2 integrin, associates with a β 2 subunit partner, CD18. CD11b-CD18 is expressed by mature myeloid cells and is widely used as an early monocyte differentiation marker. The monocytic differentiating agent VD has been shown to induce the monocytic markers CD14 and CD11b in primary AML cells and cell lines (Waxman, 2000). We followed the expression of CD14 and CD11b markers in cells after iron deprivation induced by treatment with A24, DFO or DFX. Both cell surface markers were induced by iron deprivation suggesting that cells underwent differentiation (Figure 1c) similar to VD treated cells (supplementary Figure 1b). Up-regulation of monocytic cell surface markers (initially detected in myeloblastic cells (HL60) was also observed in cell lines from myelo/monoblastic (OCI AML-3) and monoblastic (U937 and THP1) origin. Unexpectedly the promyelocytic cell line NB4 also up-regulated CD11b and CD14 surface markers when treated with iron chelating agents (Figure 1d).

Induction of cell surface markers in treated cells 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 1e and supplementary Figure 1c). Moreover, these differentiated

cells acquired functional properties of monocytes such as esterase activity (supplementary Figure 1d).

The up-regulation of differentiation marker expression induced by iron deprivation was abrogated when the cultures were supplemented with an excess of soluble iron (Figure 1f) but not when the differentiation was induced by ATRA and VD (supplementary Figure 2) confirming that monocyte differentiation is dependent on iron availability. We next investigated whether primary cells from AML patients could also be sensitive to iron deprivation therapy. 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 AML subtypes and biological parameters for the patients used in this study) and were cultured in the presence of A24 and DFO. *In vitro* dose-response studies showed that differentiation was accompanied by an arrest of cell proliferation and by the induction of apoptosis (Figures 2a and b). 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 their arrest in differentiation (Lowenberg et al., 1999), are susceptible to differentiation therapy based on iron deprivation (Figure 2C). Therefore iron deprivation is able to induce features of monocyte differentiation in primary AML blasts and cell lines.

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⁺ cells were cultured in semisolid medium supplemented with pluripotent cytokines in the presence or absence of iron deprivation agents (iron chelators or A24). Iron deprivation agents did not change the total number of colonies in methylcellulose plates (data not shown). As shown in Figure 3a, treatment with the iron chelators resulted in an increased number of bi-potent CFU-GM colonies. It also enhanced the ratio of CFU-M to the detriment of CFU-G colonies, suggesting that chelating iron from hematopoietic precursors induces commitment toward the monocyte lineage over the granulocyte lineage (Figure 3b). The erythroid lineage is particularly iron dependent since iron is necessary for hemoglobin synthesis. As expected, the number of CFU-E colonies was reduced by all the iron deprivation agents (Figure 3c).

We further induced the differentiation of CD34⁺ progenitors into granulocytes in liquid cultures (by treating cells with a cocktail of pluripotent cytokines, GM- and G-CSF for 6 days followed by G-CSF alone). Under these conditions cord blood progenitors generated a majority (over than 65%) of polymorphonuclear cells in 18 days (Figure 3d). We therefore added in these granulocyte-oriented cell cultures A24 or iron chelators every 3 days at concentrations which do not induce cell toxicity (data not shown). Under these conditions iron deprivation did not affect cord blood cell

proliferation (Figure 3e) but rather enhanced their commitment toward the monocyte 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* (Friedman, 2007; Kelly and Gilliland, 2002; Sieweke et al., 1996; Taghon et al., 2002) (Figure 3f). The cytological evaluation of the different cultures confirmed that the monocyte cell number was higher in iron-poor cultures (Figure 3g). Therefore, in hematopoiesis, iron availability could be an important factor in determining whether a hematopoietic progenitor cell differentiates into a monocyte or a granulocyte.

Iron deprivation-induced cell differentiation is dependent on the modulation of reactive oxygen species (ROS) levels

Since iron participates to the generation of hydroxyl anion through the Fenton reaction (Fenton et al., 1964) iron chelators have been proposed to be anti-oxidant agents (Kalyanaraman, 2007). However, some iron chelators have also been shown to induce the generation of ROS in specific conditions (Chaston et al., 2004). We thus decided to investigate the implication of iron-chelating agents in the modulation of ROS in AML cells.

We modulated the iron availability in cells and investigated its consequences in ROS levels. The utilization of calcein-AM combined to cell-permeant iron chelators have been shown to be a valuable method to evaluate the intracellular labile iron pools (LIP) (Esposito et al., 2002). Following hydrolyzation by intracellular esterases green fluorescent anion calcein-AM is retained in the cytoplasm in live cells. Addition of an excess cell-permeant iron chelators captures iron from calcein (a low affinity iron chelator) enhancing calcein fluorescence (Esposito et al., 2002). Therefore, the difference between calcein fluorescence before and after iron chelation reflects LIP levels. As expected, previous addition of iron deprivation agents decreased LIP levels and DFX (which has been selected for its cell-permeant features) was the fastest and most efficient agent in diminishing LIP levels in AML cells (supplementary Figure 3a-c). We used then DFX to evaluate how the reduction of LIP levels influences the production of ROS. Cells were labeled with dihydrorhodamine 123 (DHR123), an indicator of the degree of general oxidative stress or dihydroethidium (DHE), which monitors cellular superoxide production (Owusu-Ansah et al., 2008) and further left untreated or treated with DFX. Iron-deprivation of cells was readily accompanied by ROS formation (Figure 4 a) which was found to be concentration- (figure 4b) and time- (figure 4c) dependent. We further confirmed the specificity of ROS detection by preincubation of iron-deprived cells with the anti-oxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC) (Figure 4d).

Iron chelators had opposite effects when AML cells were treated during short (1-3 hours, Figure 4 a-d) or long (16-18 hours, supplementary Figures 4e-f) periods of time. In cultures treated for 16-18hr with iron-chelators, the generation of ROS by H₂O₂-exposed cells was abrogated (supplementary Figures 4d). Under these conditions, the intracellular ROS levels were reduced by iron chelators in a dose-

dependent manner (supplementary Figures 4e). This anti-oxidant effect of a long treatment with iron chelators contrasted with that of phorbol myristate acetate (PMA) and arsenic trioxide (ATO), which are known to induce a sustained production of ROS (supplementary Figures 4f).

To further clarify which, of the pro- or anti-oxidant effect of iron chelators was implicated in monocyte differentiation we treated iron-deprived AML cells with or without the anti-oxidants NAC or pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC). Anti-oxidants prevented iron deprivation-induced cell differentiation suggesting that cell differentiation is rather dependent on the increased ROS levels induced during the early course of cellular iron-deprivation (Figures 4e and 4f). Thus, iron-deprivation agents control cell differentiation through modulation of ROS levels.

Cell differentiation induced by iron deprivation is dependent on the activation of the MAPK pathway

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are serine/threonine protein kinases crucial to several biological effects such as cell proliferation and cell survival/apoptosis (Whitmarsh and Davis, 1999). MAPK are subdivided into three families (MAPK-related ERK, JNK and p38 pathways). Originally described in cell signaling induced in the response to hormones, peptides and growth factors, MAPK exert broad actions and are a critical element of stress responses including the response to UV irradiation, osmotic shock and reactive oxygen species. The addition of the specific inhibitors of ERK, JNK and p38 MAPK signaling pathways abrogated cell differentiation induced by iron-deprivation agents (Figure 5a). The iron-chelating agents induced the activation of the MAPK-related ERK and p38 and JNK pathways, as evidenced by the phosphorylation of their molecular effectors (Figure 5b). However, only inhibitors of JNK and p38, but not of ERK, prevented iron deprivation-induced apoptosis (Figure 5c).

Cell differentiation shares high similarity with the differentiation agent vitamin D3

Several reports have shown that vitamin D3 (VD) can induce monocyte/macrophage differentiation of both normal and leukemic myeloid leukemia cell lines (Abe et al., 1981; Bastie et al., 2004; Gemelli et al., 2008; Hmama et al., 1999; Hughes et al., 2009; Ji and Studzinski, 2004; Koeffler et al., 1984). 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 modulated by treatment with VD (Figure 6a 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 6b). As VDRE sequences have not been identified in the promoter regions of

many VD-inducible genes, including CD14, we attempted to identify an alternative signaling pathway. 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 (Himes et al., 2006; Wang et al., 2003). Effectively, in gene chips, the *c-Jun* gene was found to be induced by both VD and iron deprivation (Figure 6c). Moreover, we confirmed these data by RQ-PCR since transcripts coding for *c-Fos* and *c-Jun* were up-regulated by both treatments (Figure 6d). These data were further extended in cell lines from different AML subtypes (figure 6e).

JNK have been implicated in monocyte differentiation. JNK phosphorylation is induced by monocyte colony-stimulating factor (M-CSF, CSF-1) (Himes et al., 2006). VD signaling has been also described to be dependent on JNK activation (Buitrago et al., 2006). To further address the role of JNK signaling in cell differentiation induced by iron deprivation, cells were transfected with microRNA constructs specific for different members of JNK pathway (namely JNK1, JNK2 and *c-Jun*) (supplementary fig 4a and b). MicroRNA-mediated silencing of *c-Jun*, JNK1 and JNK2 markedly abrogated cell differentiation induced by iron-deprivation agents (Figure 6f). Based on experiments from knockout mice, JNK1 and JNK2 have been proposed to converge in several cell functions. However in some cases, JNK1 and JNK2 exert non-overlapping function (Bode and Dong, 2007). By changing the balance between the two JNK forms by overexpression of each one of the two proteins we observed that JNK1 was the most effective to induce cell differentiation of AML cells (figure 6g). Given the high similarities shared between VD and iron-deprivation agents to induce cell differentiation, we investigated whether iron deprivation of cells could induce VD signaling (Himes et al., 2006; Wang et al., 2003). As observed for its cognate ligand VD, VDR expression was induced in cells treated by iron-chelating agents (figure 6h). VDR phosphorylation at Ser-208 by casein kinase II has been shown to amplify VDR signaling (Jurutka et al., 1996). The addition of iron chelators to cells starved of growth factors readily induced the VDR phosphorylation (Figure 6i). These results indicate that iron chelating agents are able to induce cell differentiation through the activation of JNK pathway. Iron-deprivation also potentiates VDR signaling pathway through VDR expression and VDR phosphorylation.

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

The treatment of cells with both iron chelators and VD drastically increased the up-regulation of monocyte markers CD11b and CD14 (Figure 7a). We consequently investigated whether the combination of iron-chelating agents and VD had a synergistic effect. Applying the combination-index (CI) isobologram method (Chou, 2006), we evaluated the nature of DFO and VD, and A24 and VD interactions (supplementary fig5a-d). At the concentration inducing 50% of CD14+ cells, CI values for the combination of DFO and VD, and A24 and VD were less than 1 (0.87 and 0.89 respectively) indicating a synergistic interaction. The association of both

drugs was accompanied by morphological changes in the treated cells (Figure 7b) and higher expression of VDR (figure 7c). 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 7d). VD activates the MAP kinases pathway to modulate the transcription of genes implicated in cell differentiation. The synergy was also observed for the activation of the JNK pathway, because *c-Fos* and *c-Jun* expression was notably up-regulated by the combined treatment (Figure 7e). Moreover, the phosphorylation of JNK increased in response to treatment with both VD and iron deprivation (Figure 7f). The combined effect of VD and iron chelators was specific of VDR signaling since iron chelators did not potentiate the ability of ATRA to promote cell differentiation in NB4 cells (supplementary fig 6). Finally, we validated the efficacy of the combined therapy *ex-vivo* in primary cells from AML patients (Figure 7g).

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

Based on these observations, we postulated that the combination of iron deprivation and VD could intensify their anti-leukemic properties. Therefore as a first step, the efficacy of differentiation therapy was further evaluated *in vivo* in a mouse tumor xenograft model. A single dose of A24 completely prevented the growth of HL60 transplanted tumors, whereas treatment with DFO increased survival and decreased the tumor size (Figures 8a and 8b). We did not observe a significant reduction in tumor growth for mice treated with VD alone (supplementary fig7a). However, the combination of VD with DFO significantly reduced tumor growth (Figure 8c). In OCI-AML3 xenografts cells DFO greatly improved event-free survival (EFS) in mice (supplementary figure 8b). There was no significant difference in EFS between mice treated with DFO and DFO+VD. However, a significant reduction in tumor growth was obtained only in mice which received the DFO+VD association although the DFO-treated mice presented reduction in tumor growth compared to control which did not reach significance (supplementary figure 8c) 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 8d). The reduced tumor growth was associated with tumor cell apoptosis, features of cellular differentiation and MAPK phosphorylation (ERK and JNK) (Figure 8e).

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 monocyte numbers (Figure 9a) without inducing hypercalcemia (Figure 9b). Importantly, MGG blood smears revealed an increased number of differentiating cells towards the monocyte lineage, suggesting that they were derived from the blast pool (Figure 9c). Cell sorting (Figure 9d) followed by fluorescent *in situ* hybridization 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 9e), confirming that the circulating monocytes were derived from the blast pool. In addition, the patient's quality of life was improved since red cells and platelets transfusion needs were decreased. As well, the patient could control several microbial infections that otherwise would have been life threatening suggesting that patient's immune status was partially restored. These data underscore the differentiating efficiency of combined therapy in humans.

FIGURES

Callens *et al.* Figure 1

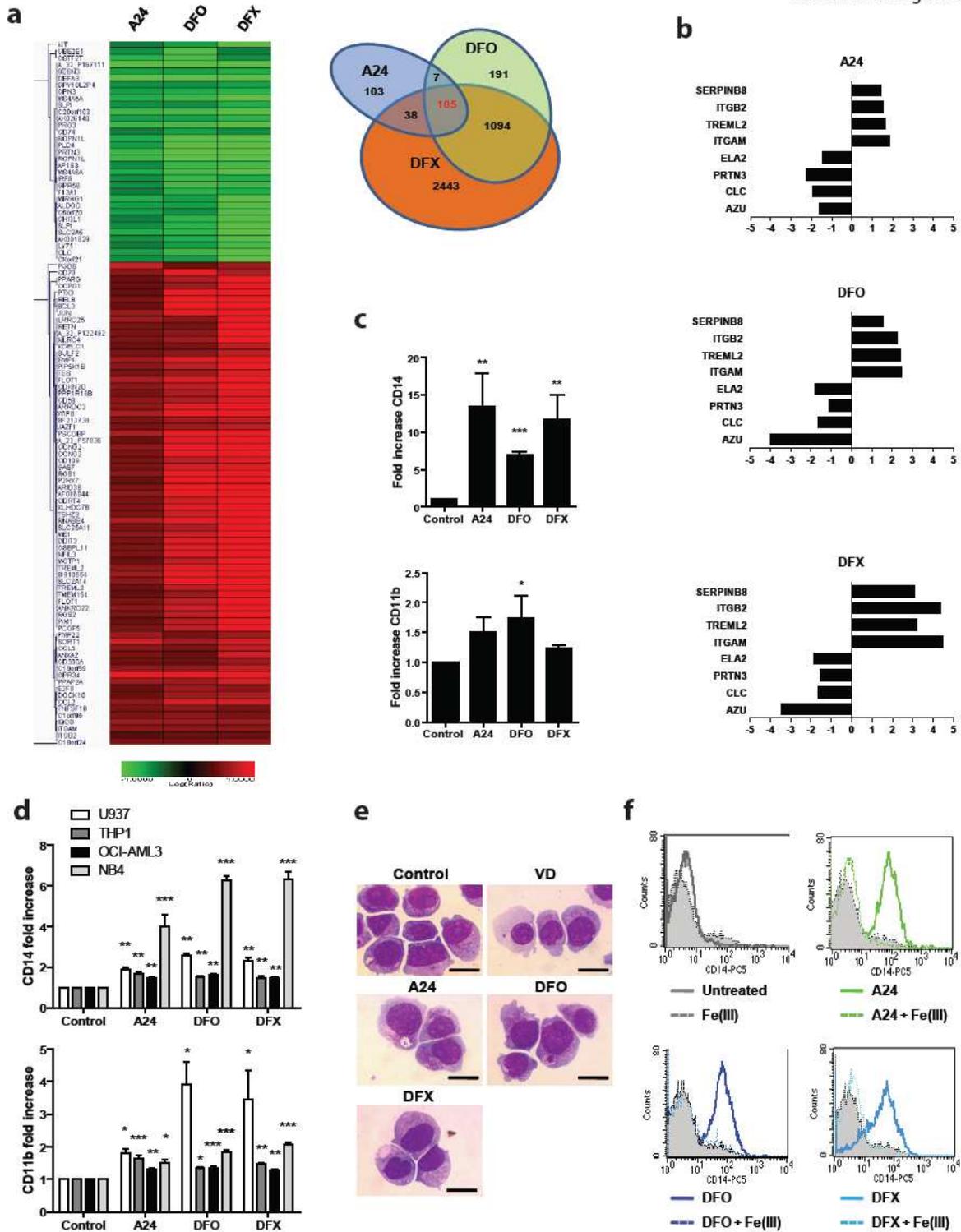


Figure 1: Iron deprivation induces monocyte differentiation in AML cells

(a) Agilent microarray unsupervised analysis of HL60 cells following 48-h exposure to 10 $\mu\text{g/ml}$ 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) 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)** Fold changes of genes expression in differentiated cells relative to untreated cells. A24 and the iron chelators up-regulated monocyte/macrophage-specific genes and down-regulated myelocyte specific genes. Up-regulation is represented on the positive scale, and down-regulation is indicated on the negative scale. **(c)** Fold increase of CD14 and CD11b expression following flow cytometry (MFI relative to untreated cells) in HL60 cell line treated with A24 (10 $\mu\text{g/ml}$), DFO (5 μM) or DFX (3 μM) for 72 h (mean \pm SEM, $n=3$). **(d)** Fold increase of CD14 and CD11b expression evaluated by flow cytometry (MFI relative to untreated cells) in U937 (white), THP1 (dark grey), OCI-AML3 (black) and NB4 (light grey) cell lines treated with A24 (10 $\mu\text{g/ml}$), DFO (5 μM) or DFX (3 μM) for 72 h (mean \pm SEM, $n=3$). **(e)** MGG-stained cytopspins of HL60 cells treated with with VD (250nM), A24 (10 $\mu\text{g/ml}$), DFO (5 μM) or DFX (3 μM) for 72 h. 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. Scale bar, 10 μm . Magnification: x 630. Representative photos of 3 independent experiments are shown. **(f)** FACS analysis of 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_3 (discontinuous thin line) for 72 h. The filled histograms represent staining with the isotype control antibody. One representative experiment of three experiments is shown.

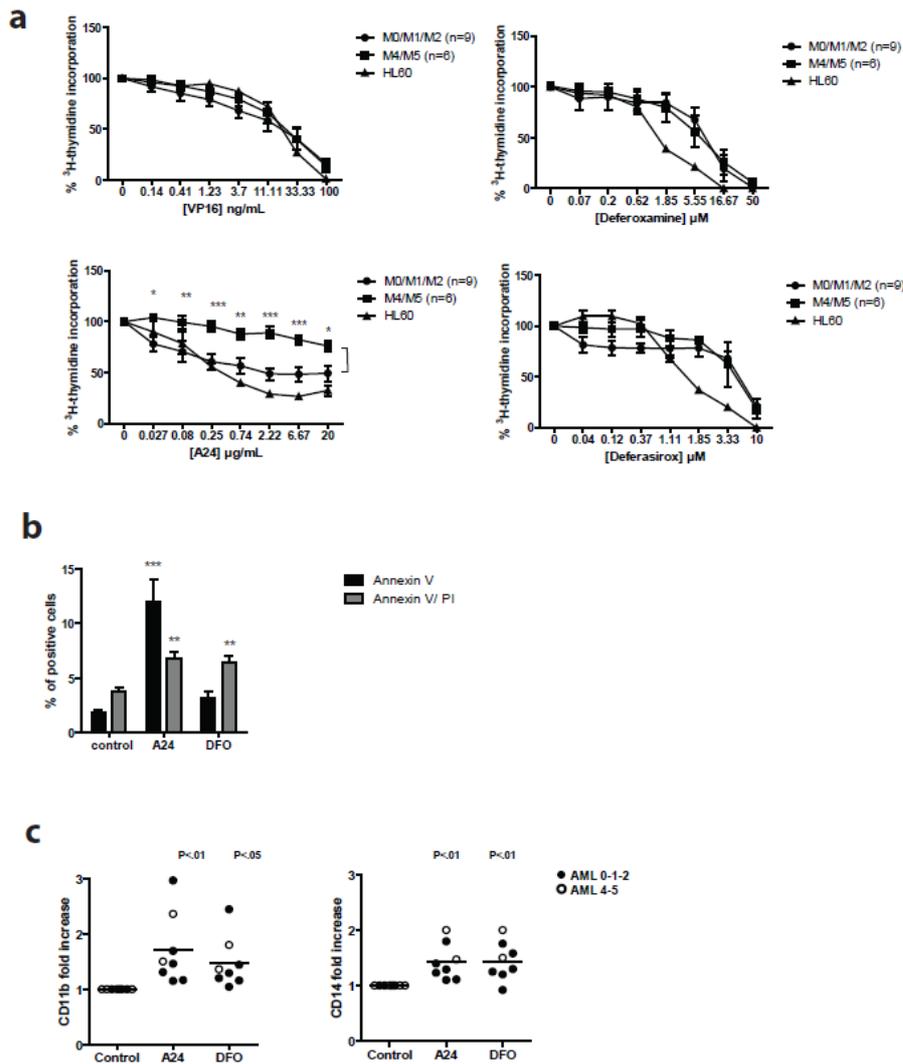


Figure 2. Iron deprivation inhibits proliferation and induces differentiation of AML blasts.

(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 followed by a 16h period of [³H]-thymidine incorporation. Thymidine incorporation (% over the control) was plotted as the mean ± SEM of grouped M0/M1/M2 (*n*=6) or M4/M5 (*n*=9) subtypes patients. **(b)** HL60 cells were cultured in the presence or absence of A24 (10μg/ml) or DFO (5μM) for 72 h. Early and late apoptosis was evaluated by flow cytometry using annexin V-FITC/PI labeling (mean ± SEM, *n*=3). **(c)** 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 shown.

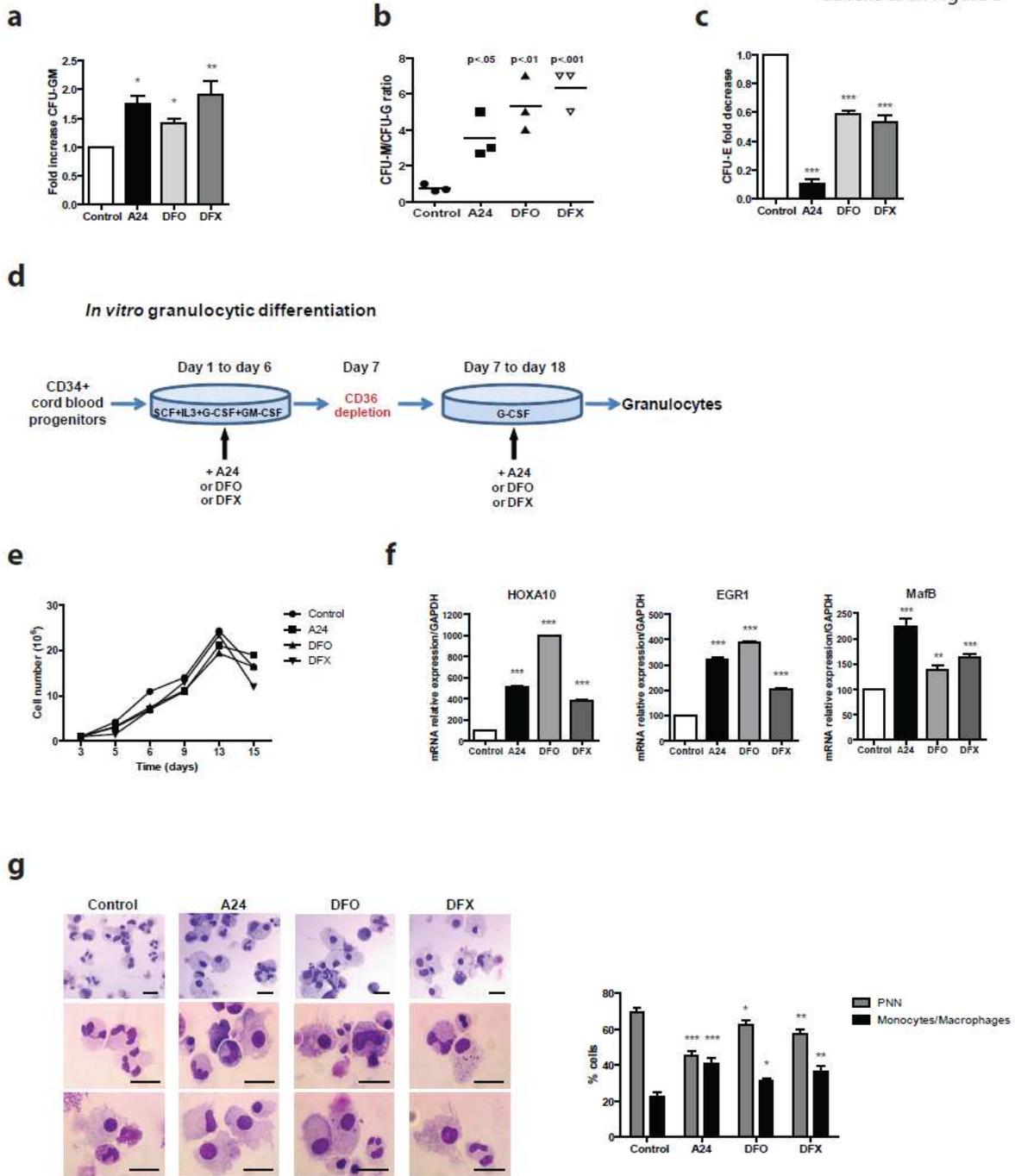


Figure 3. Iron deprivation induces the differentiation of primary progenitors into monocytes.

CD34⁺ cord blood progenitors were plated in methylcellulose containing a cocktail of cytokines (Epo, SCF, IL-3, G-CSF and GM-CSF) in the presence or in the absence of A24 (10 µg/ml), DFO (5 µM) or DFX (3 µM). After 14 days colonies of each lineage were counted (mean ± SEM, *n*=3). Variation of colonies were represented as: **(a)** Fold increase of CFU-GM **(b)** Ratio of CFU-M/CFU-G. **(c)** Fold decrease of CFU-E. **(d)** Schematic representation of the generation of granulocytes in liquid cultures. CD34⁺ progenitors cord blood cells were cultured for 18 days as described in supplementary methods. A24 (10µg/ml), DFO (5µM) or DFX (3µM) were added every 3 days in the culture medium. **(e)** Cell numbers and viability measured by Trypan blue dye exclusion during culture. One representative experiment of three is shown. All counts were performed in triplicates. **(f)** 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). **(g)** Representative photos taken at the end of culture (day 18) are shown. Polymorphonuclear neutrophils 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 each leukocyte population from May-Grünwald Giemsa (MGG) colored cytopins at day 18 (mean ± SEM, three independent counts of 100 cells each).

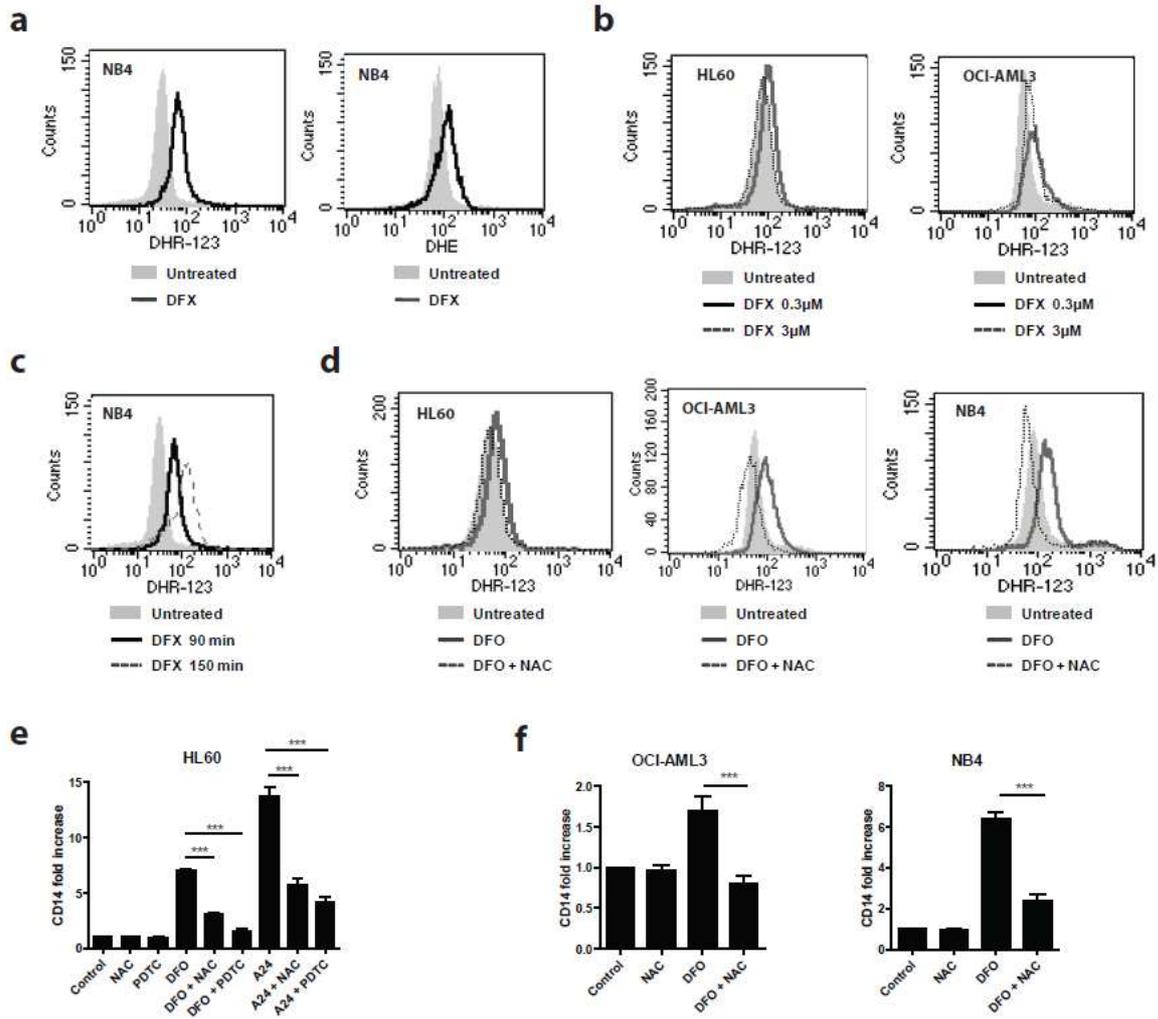
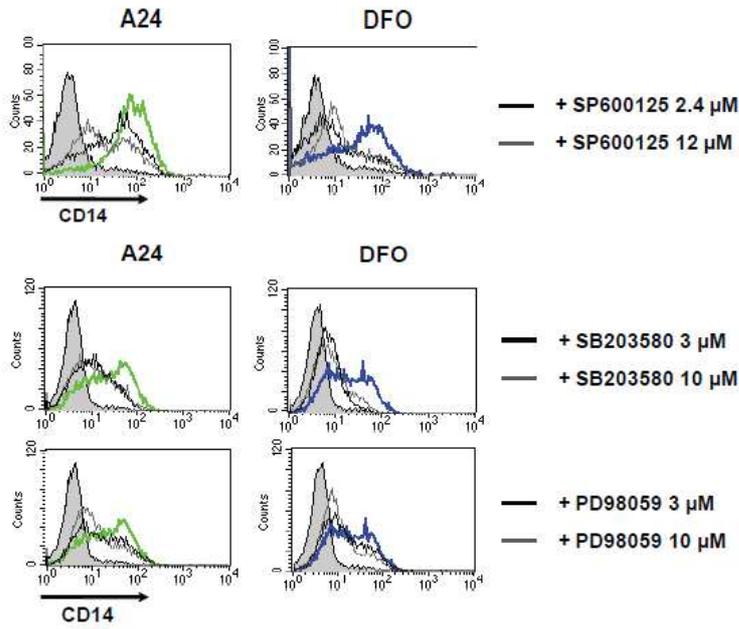


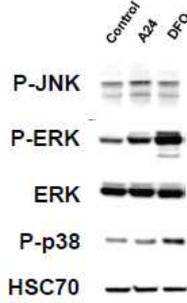
Figure 4: Modulation of ROS levels controls monocyte differentiation in AML cells

(a) Representative flow cytometry analysis showing ROS production by NB4 cells. Cells were stained for 30 minutes at 37°C with 0.5 μ M dihydrorhodamine 123 (DHR123) or 1 μ M dihydroethidium (DHE) and further treated with 3 μ M deferasirox (DFX) (continuous bold line) or not (filled histograms) for 90 minutes. **(b)** ROS production in AML cell lines (HL60 and OCI-AML3 cells) is dose-dependent. Cells were labeled with DHR123 (as described in a) and treated with 3 μ M deferasirox (bold continuous line) or 0.3 μ M deferasirox (thin discontinuous line) for 90 minutes or not (filled histograms). **(c)** time-dependent production of ROS. NB4 cells were treated with 3 μ M deferasirox (DFX) for 90 minutes (bold continuous line) or 150 minutes (thin discontinuous line). ROS production was evaluated by flow cytometry. **(d)** Representative flow cytometry data showing specificity of the ROS production by NB4 cells. Cells were stained for 30 minutes at 37°C with 0.5 μ M DHR123 and further treated with 3 μ M deferoxamine (DFO). Abrogated ROS detection in cell cultures where DFO was added in the presence of the anti-oxidant N-acetyl-l-cysteine (NAC) (discontinuous thin line) as compared to control untreated cells (filled histogram). **(e)** CD14 expression (fold change) in HL60 cells treated with A24 (10 μ g/ml) and DFO (5 μ M) in the presence or in the absence of the anti-oxidant agents (NAC and PDTC) for 72 h. **(f)** CD14 expression in OCI-AML3 and NB4 cells treated with DFO in the presence or in the absence of the anti-oxidant agent NAC for 72h.

a



b



c

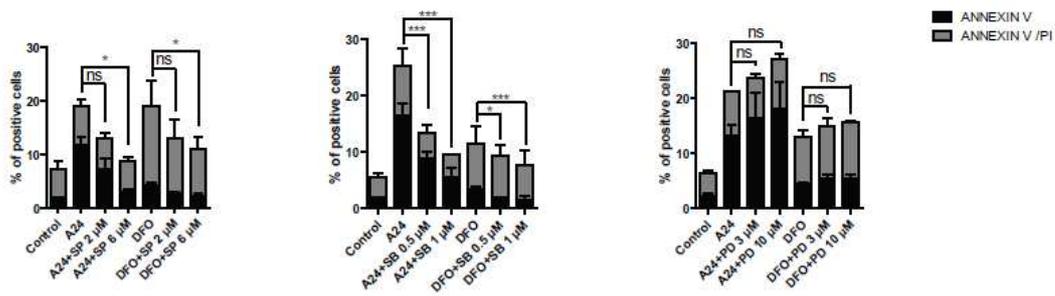


Figure 5 : Cell differentiation and apoptosis are controlled by MAPK activation

(a) 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 μ M (black thin lines) or 12 μ M (gray thin lines), with a p38 inhibitor (SB203580) or a ERK inhibitor (PD98059) at 3 μ M (black thin lines) or 10 μ M (gray thin lines) or mock treated for 72h. Filled histograms represent staining with the isotype control antibody. One representative experiment of three experiments is shown. **(b)** Serum-starved HL60 cells were incubated with A24 (10 μ g/ml) or DFO (3 μ M) for 30 min at 37°C. Whole-cell extracts were analyzed by immunoblotting, demonstrating the phosphorylation of JNK (p-JNK), ERK (p-ERK) and p38 (p-p38). One representative experiment is shown. HSC70 and ERK were used as equal loading controls. **(c)** Histograms representing early and late apoptosis/necrosis using flow cytometry with annexin V-FITC/PI labeling. HL60 cells were cultured for 72h in the presence or absence of A24 (10 μ g/ml) or DFO (5 μ M) and treated with 2 or 6 μ M JNK inhibitor (SP600125, SP), 0.5 or 1 μ M p38 inhibitor (SB203580, SB), 3 or 10 μ M ERK inhibitor (PD98059, PD) or mock treated (mean \pm SEM, $n=3$).

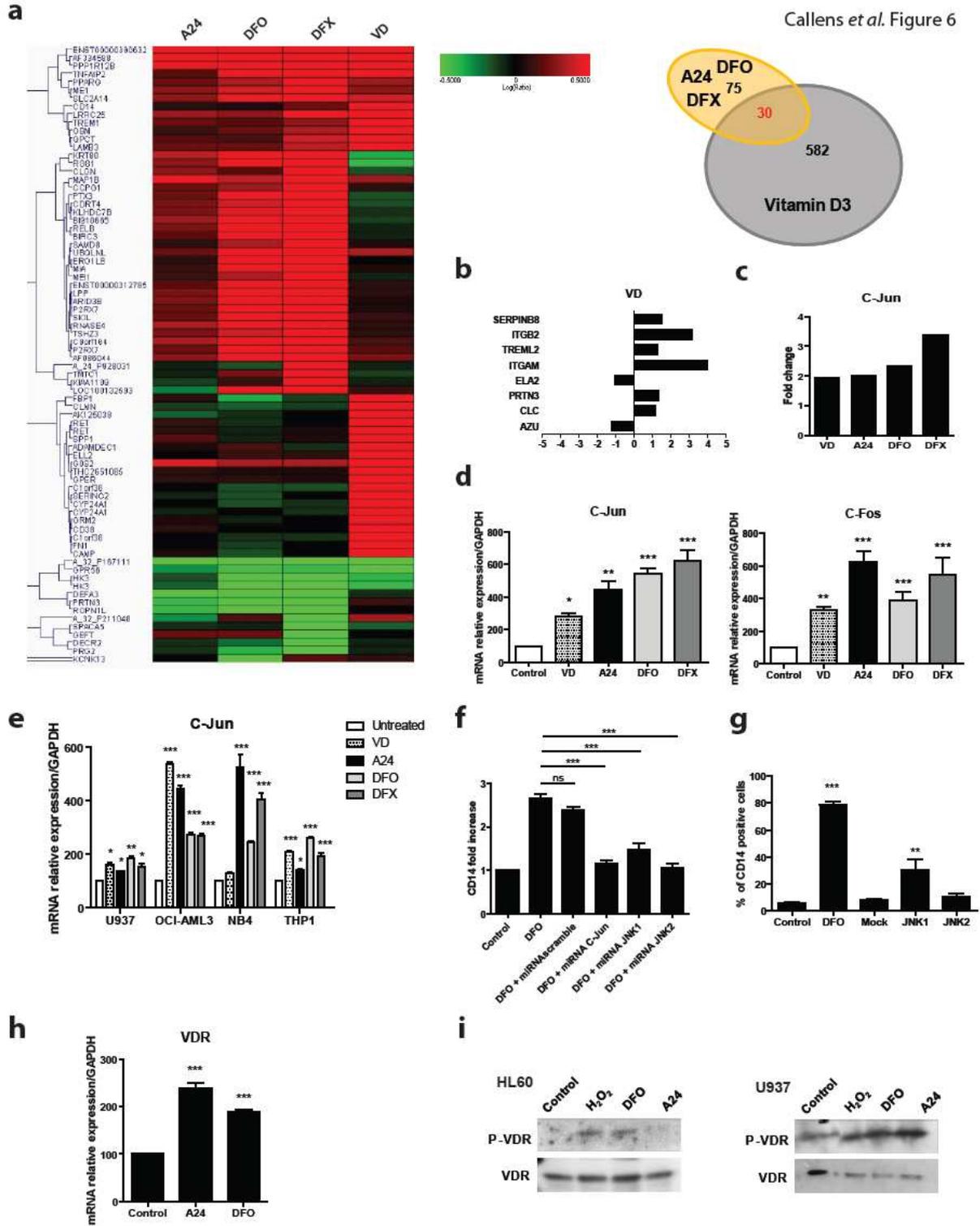


Figure 6: Cellular differentiation induced by iron deprivation is dependent on the activation of the JNK and VDR signaling pathways

(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 <10⁻¹⁵ are shown (**left**). 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)** Genechip 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 (VD, 250 nM; A24, 10 µg/ml; DFO, 5 µM or DFX, 3 µM; mean ± SEM, $n=4$). **(e)** *c-Jun* mRNA level evaluated by quantitative RT-PCR and normalized to *GAPDH* mRNA in U937, OCI-AML3, NB4 and THP1 cell lines treated for 48 h with the indicated agents (VD, 250 nM; A24 10 µg/ml; DFO 5 µM or DFX 3 µM; mean ± SEM, $n=4$). **(f)** fold increase of CD14 expression in HL60 cells transfected with the indicated micro RNA constructs: scrambled control miRNA, miRNA-C-Jun, miRNA-JNK1 or miRNA-JNK2. Forty-eight hours later each transfected cells were treated with DFO (5µM) to induce cell differentiation. CD14 expression was evaluated by flow cytometry gating on cells on the basis of their GFP expression 72h after transfection (mean ± SEM, $n=3$). **(g)** Percentage of differentiated cells induced in HL60 treated for 72h with DFO or transfected with JNK1-GFP and JNK2-GFP expression plasmids or mock electroporated. CD14 expression was evaluated 72h after treatments (mean ± SEM, $n=3$). **(h)** *VDR* 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 or DFO, 5 µM; mean ± SEM, $n=4$). **(i)** Serum-starved HL60 and U937 cells were incubated with H₂O₂ (0,5µM), A24 (10 µg/ml) or DFO (3 µM) for 10 min at 37°C. Phosphorylation of VDR (P-VDR) in whole-cell extracts analyzed by immunoblotting. VDR was used as loading control. One representative experiment is shown.

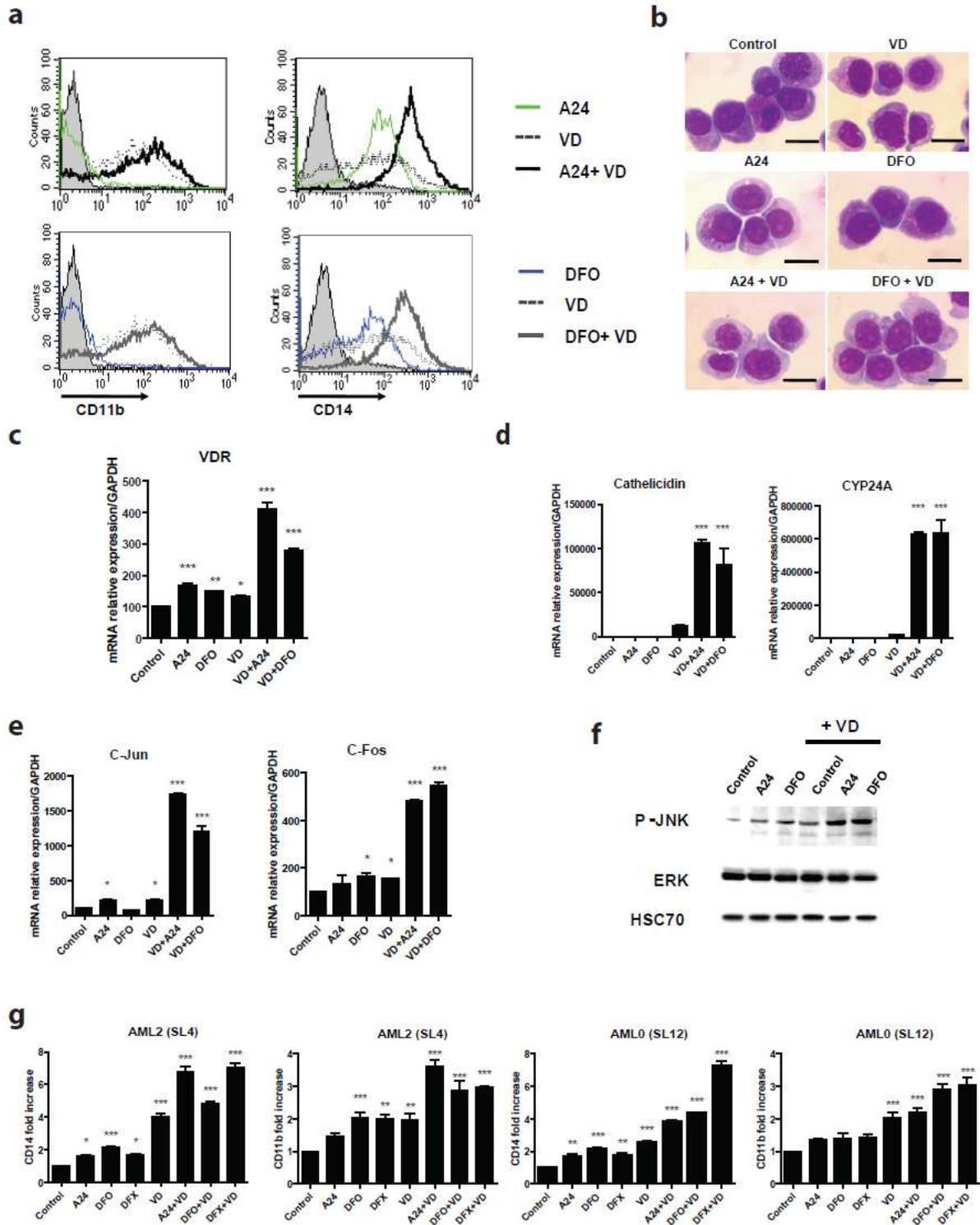


Figure 7: VD synergizes with iron deprivation agents to activate the Jun pathway and induce cellular differentiation.

(a) Flow cytometric analysis of CD14 and CD11b expression on HL60 cells treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ 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)** HL60 cells were incubated with A24 (10 $\mu\text{g/ml}$) 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. Monocyte differentiation is observed with the loss of granulation and basophilia, vacuole appearance and cytoplasm enlargement. **(c)** 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 $\mu\text{g/ml}$; DFO, 5 μM ; or VD, 250 nM) (mean \pm SEM, $n=4$). **(d)** 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 $\mu\text{g/ml}$; DFO, 5 μM ; or VD, 250 nM) (mean \pm SEM, $n=4$). **(e)** 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 \pm SEM, $n=4$). **(f)** Serum-starved HL60 cells were incubated with A24 (10 $\mu\text{g/ml}$) 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 immunoblotting, demonstrating the increased phosphorylation of JNK when VD is combined with A24 or DFO. HSC70 and total ERK were used as loading controls. **(g)** Fold increase of CD14 and CD11b expression analyzed by flow cytometry (MFI relative to untreated cells) in primary blasts from two AML patients, identified as SL4 (AML2 FAB subtype) and SL12 (AML0 FAB subtype). Cells were treated with A24 (10 $\mu\text{g/ml}$), DFO (5 μM), DFX (3 μM) or VD (250 nM) or their association as indicated for 72 h (mean \pm SEM, $n=3$).

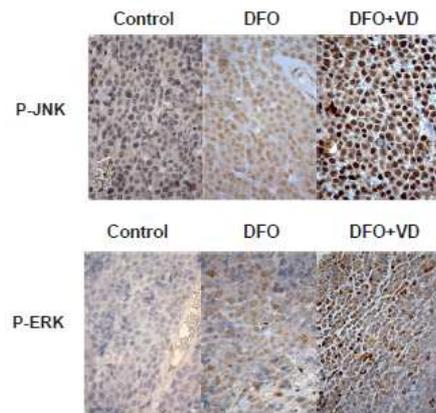
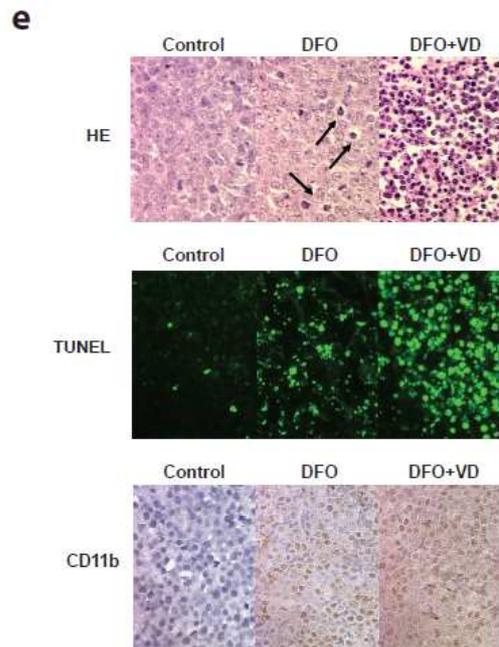
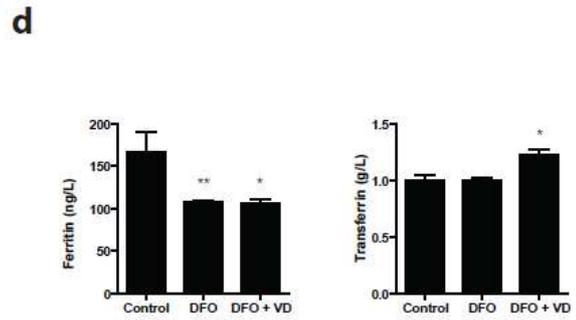
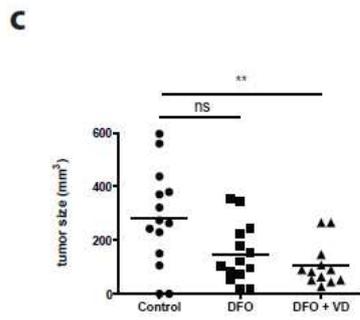
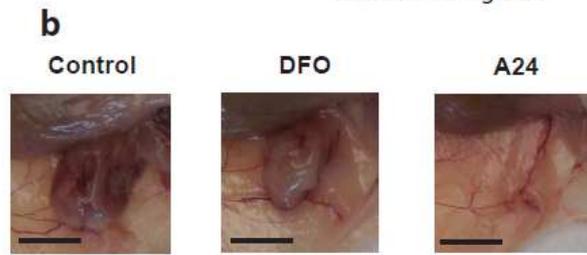
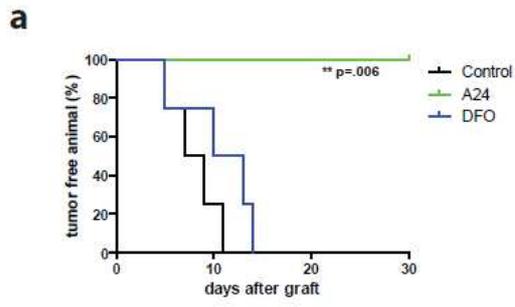


Figure 8: Anti-tumor effect of iron deprivation combined with Vitamin D in Nude mice.

(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 ($n=4$ in each group). 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 iron 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 by TUNEL technique or labeled with CD11b-, p-ERK- or p-JNK-specific antibodies. The arrowheads indicate apoptosis. (Magnification: x 400).

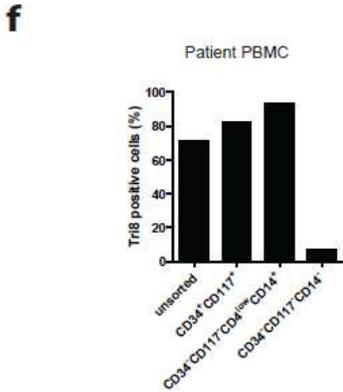
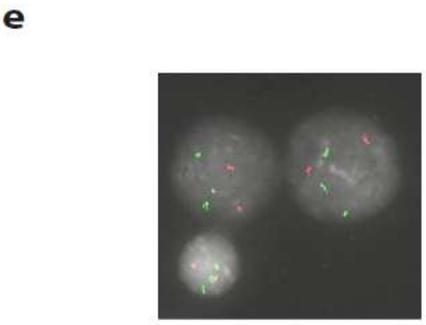
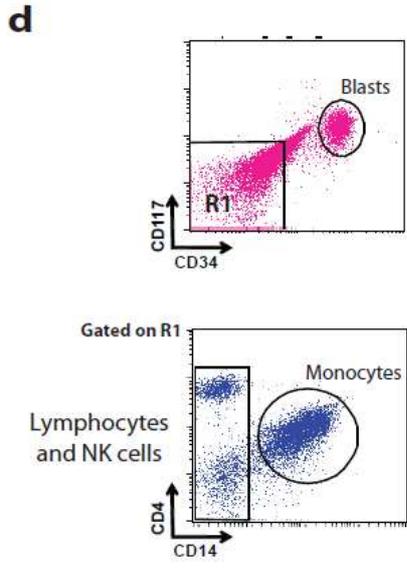
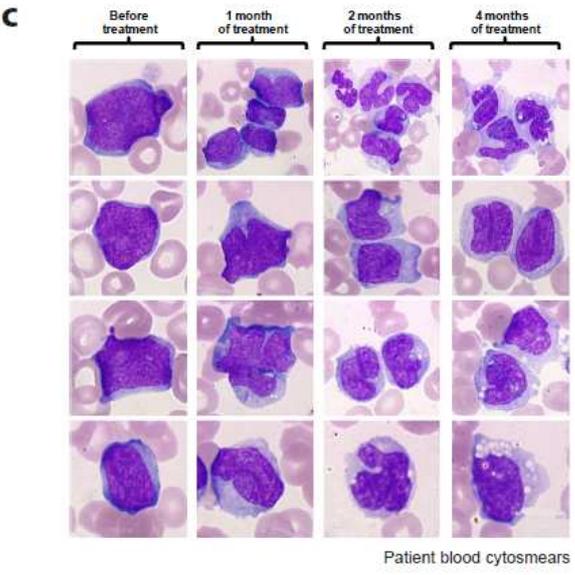
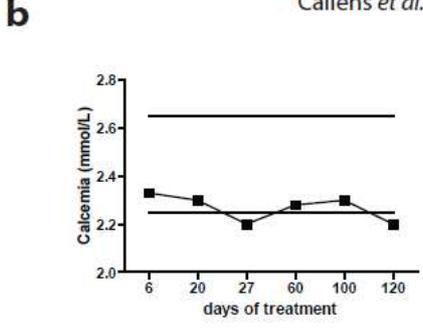
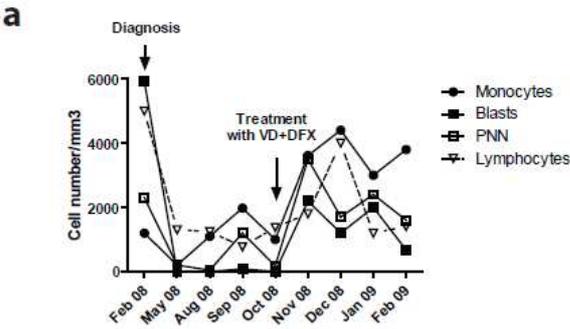


Figure 9: Iron chelation therapy in combination with VD treatment induced blast differentiation in a refractory AML/MDS patient

(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. Horizontal bars represent minimal and maximal physiological levels of calcemia **(c)** MGG-stained blood cytosmears during treatment. At diagnosis, undifferentiated blasts were predominantly observed in MGG-stained blood cytosmears. One month after beginning treatment, the blasts started to present signs of monocyte 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)** 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.

DISCUSSION

We show in this report that iron homeostasis plays a key role in the control of monocyte differentiation in both normal and pathological situations. Comparison by transcriptome analysis of genes targeted by cell treatment with the anti-TfR1 mAb A24 (which blocks ^{55}Fe -Tf uptake) (Moura et al., 2004) and by iron chelators (DFO and DFX) identified 105 genes modulated by iron deprivation. Since A24 targets TfR1 (the major receptor involved in the iron entry in the cells) whereas iron chelators (besides their ability to sequester iron) can also capture several bivalent ions (e.g. Mn^{2+} , Cu^{2+} or Zn^{2+}) which could modulate genes irrelevant to iron homeostasis, identification of overlapping genes allowed to avoid off-target genes. Among these 105 genes were several markers of monocyte/macrophage cells, confirming that monocytic differentiation is highly dependent on iron homeostasis. We confirmed this finding and showed that iron deprivation induced primary progenitors commitment toward monocyte lineage and reestablished differentiation in AML blasts/cell lines.

Recent cumulated data in the literature have shown that reactive oxygen species (ROS) can modulate the activation of signal transduction pathways involved in several cellular functions such as cell proliferation and differentiation (Sattler et al., 1999). Specifically, in the mammalian hematopoietic system, it has been recently reported that hematopoietic stem cells produce low levels of ROS which are increased in common myeloid progenitors (CMPs). This modulation in ROS levels seems to be important in the control of myeloid precursors differentiation (Tothova and Gilliland, 2007; Tothova et al., 2007). Owusu-Ansah and Banerjee have recently shown that *Drosophila* multipotent hematopoietic progenitors display increased levels of ROS which are downregulated during differentiation. Accordingly, our work indicates that intracellular labile iron pool (LIP) modulates ROS levels. Therefore the amount of labile iron could be a critical factor controlling ROS levels and thus, cell differentiation, in the hematopoietic system.

Scavenging the ROS from *Drosophila* hematopoietic progenitors delays mature blood cells differentiation which is dependent on MAPK/JNK (Owusu-Ansah and Banerjee, 2009). Consequently, MAPK/JNK seems to be the major pathway implicated in the differentiation of AML cells as well as hematopoietic *Drosophila* cells (Owusu-Ansah and Banerjee, 2009). In the present study, both genetic and pharmacological inactivation of MAPK/JNK pathway abrogated iron deprivation-induced cell differentiation. MAPK pathways transduction cascades frequently converge to amplify signal transduction (Johnson and Lapadat, 2002; Lopez-Bergami et al., 2007). In agreement with this signal convergence, blocking of ERK and p38 pathways also inhibited cell differentiation suggesting that a crosstalk between MAPK pathways could cooperate to regulate AML cell differentiation. Furthermore, pharmacological blocking of ROS production abrogated iron deprivation-induced cell differentiation suggesting that ROS and MAPK pathways are linked (most probably by the direct effect of ROS on MAPK activation (Martindale and Holbrook, 2002)).

In the majority of the experiments presented here TfR1-targeting by A24 mimicked the effect of iron chelators at least in *in-vitro* and *ex-vivo* settings. Since each of the iron-chelating agents has its own pharmacological (such as kinetics and half-life) and biochemical characteristics, the intensity of the response varied among them. For example, in tumor xenografts experiments, A24 monoclonal antibody totally inhibited tumor engraftment whereas iron chelators delayed the tumor growth, a difference probably involving additional effects of A24 such as antibody-dependent cellular cytotoxicity or complement-dependent cytotoxicity. However, both classes of iron-deprivation agents (anti-TfR antibody and iron chelators) induced apoptosis and reduced tumor growth.

The principal molecular mechanism drawn from the experiments reported here are that signaling pathways activated by iron deprivation and VD are highly related. Gene expression studies showed a high similarity (30% common genes) between genes modulated by VD and the list of 105 genes targeted by cell iron deprivation. In addition, iron deprivation induced both VDR gene expression and VDR phosphorylation. The phosphorylation of VDR on serine 208 by casein kinase II (CK-II) has been shown to control activation of VDR gene transcription and VDR target genes expression (Jurutka et al., 1996). Therefore, iron deprivation could induce by itself the activation of VDR signaling pathway. Furthermore, the combination of iron deprivation agents and differentiating therapies acted synergistically, increasing AML cells differentiation.

VD is known to induce myeloid progenitors to differentiate into monocytes. *In vitro* and *ex-vivo* experiments were promising but in the first clinical trials in AML and MDS, only partial differentiation was obtained and clinical improvements were modest. In addition, symptomatic hypercalcemia, which is induced by VD, limits its clinical application. Clinical trials using VD analogs which do not promote hypercalcemia, did not improve patients' prognosis (Koeffler et al., 2005), suggesting VDR stimulation alone is not sufficient to promote clinical benefit. In 2004, Ferrero *et al.* reported encouraging preliminary results in 30 AML and MDS patients treated with the combination of low dose cytarabine with ATRA, VD and 6-thioguanine (Ferrero et al., 2004). Therefore, combining VD treatment with other agents with pro-differentiation potential may be of therapeutic interest. We show here that iron deprivation could be one such a new therapeutic approach in AML, and likely in MDS, since it induced both pro-differentiating and anti-proliferative effects in leukemia cells from one AML patient, as described here in a case report. The synergy between iron chelators and VD (low dose) induced blast differentiation in this patient without emergence of hypercalcemia.

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is nowadays the best known approach to cure poor prognosis AML. In studies of patients undergoing allogeneic HSCT, non-transferrin bound iron (NTBI) and transferrin saturation were enhanced after initiation of the conditioning regimens. High level serum ferritin before HSCT unfavorably impacts overall survival of HSCT and this has been attributed to NTBI (Armand et al., 2007). These observations may emphasize a possible

deleterious role of NTBI for the hematopoietic reconstitution. Iron overload also seems to be associated with a higher risk of bacterial and fungal infections. For example, it has been shown that *Candida albicans* growth is elevated in serum from patients with acute leukemia which was directly correlated with an elevated NTBI (Caroline et al., 1969). In our case report, the patient developed multiple infectious episodes which were greatly reduced after the initiation of VD and iron chelation combined therapy. *In vitro* experiments showed that, in addition to its role in monocyte differentiation, the associated therapy promoted expression of genes related to antimicrobial defense such as cathelicidin. Therefore, the early use of iron chelators in AML therapy could act at multiple levels: by preventing red cells transfusion-derived secondary hemochromatosis, by avoiding defective bone marrow reconstitution after allogeneic HSCT, and also by improving patients' immune status. Recently, a study reported that deferasirox has favorable effects on hematopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes (Porter et al., 2008). The authors associated this benefit with the decrease of labile iron pool and the suppression of ROS by deferasirox. Our observations are concordant with them and we postulate that benefit would be best if iron chelation is associated with VD.

Therefore, we propose that therapeutic approaches based on association of iron deprivation with VD could open new perspectives in the treatment of AML and MDS. 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. This combined therapy could be also relevant in other diseases involving a deregulation of BM differentiation, such as myelodysplastic syndromes. Additional clinical studies are needed to validate its efficacy and determine in which patients it will be more beneficial.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

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). Myelocytic (HL60 and OCI-AML3), monoblastic (THP1 and U937) and promyelocytic (NB4) leukemia cell lines used in the present study were kindly provided by J.M. Cayuela (Hôpital Saint-Louis, Paris) and P. Villarese (Hôpital Necker, Paris). Cells were cultured in RPMI-1640 medium (Invitrogen) supplemented with 5% FCS and antibiotics.

Cell treatment and proliferation assays

Deferasirox (DFX) was provided by Novartis. Etoposide (VP16), retinoic acid (ATRA), deferoxamine (DFO), 25-OH-VitaminD3 (25-hydroxycholecalciferol) (VD), H₂O₂, FeCl₃, N-Acetylcysteine (NAC) and pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) were purchased from Sigma-Aldrich. Calcein-AM, Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) and dihydroethidium (DHE) were purchased from Invitrogen. The mAb A24, was produced and purified as described previously (Moura et al., 2001). The inhibitors of JNK (SP600125), ERK (PD98059) and p38 (SB203580) were from Santa Cruz Biotechnology.

For 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 2.5×10^4 cells per well in 96-well tissue culture plates (Falcon) in 200 μ l culture medium. Proliferation was measured as described previously (Lepelletier et al., 2007).

Calcein assay for intracellular labile iron pools (LIP)

LIP was evaluated according to a previously described method (Esposito et al., 2002) with some modifications. Briefly, cells were treated with 0.5 μ M calcein-AM for 30 minutes at 37°C. Before being subjected to flow cytometry analysis cells were treated or not with an excess of cell-permeant iron chelators. The fluorescein channel was employed to detect calcein fluorescence. The difference between calcein fluorescence before and after adding cell-permeant iron chelators indicated the relative amount of LIP (Esposito et al., 2002).

Measurement of intracellular ROS

Fluorescence analysis was used to determine the relative levels of ROS in response to various stimuli. ROS levels were detected by FACS analysis. Labeling with cell-

permeant redox-sensitive fluorochromes was performed for 30 minutes at 37°C in the presence of 1µM dihydroethidium (DHE) or 0.5µM dihydrorhodamine (DHR-123) both diluted in 0.5% BSA in HBSS solution (Invitrogen).

Overexpression and silencing of JNK1, JNK2 and c-Jun

For overexpression, pEGFP-C3 (Clontech) expression vectors containing cDNA encoding JNK1 or JNK2 between the HindIII/BamHI sites (kindly provided by T. Herdegen; Institute of Pharmacology, University Hospital Schleswig-Holstein, Kiel, Germany) were used. These proteins were expressed as a GFP fusion protein under the control of human CMV immediate early promoter.

For *C-Jun*, *JNK1* and *JNK2* genes silencing, artificial miRNA constructs were generated. Four sets of predesigned miR RNAi sequence oligonucleotides for each gene were obtained using BLOCK-iT™ miR RNAi Select (Invitrogen) and checked to ensure the designed sequences would not target other gene transcripts to avoid any off-target effects. These oligonucleotides were annealed and ligated into pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR vector according to the manufacturer's instructions (Invitrogen) to express the pre-miRNA as an EmGFP fusion under the control of human CMV immediate early promoter. The pcDNA 6.2-GW/EmGFP-miR-negative control plasmid contains a scrambled miRNA insert, which is predicted not to target any known vertebrate gene.

HL60 cells were transfected with the plasmids using the Amaxa nucleofactor as described above (usually 40% cells were transfected). DFO (5µM) was added in culture medium 48h after transfection and flow cytometry analysis was realized 24h later on the basis of the EmGFP (for miRNA) or EGFP (for protein constructs) expression. Validation of miRNA constructs was performed on CHO cells electroporated with each miRNA-containing plasmid using the Amaxa nucleofactor and analyzed in western blotting after 24h to validate the constructs.

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), used 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 (Livak and Schmittgen, 2001). The complete list of primer sequences is available in the table 4 in the supplementary data section.

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 the Resolver software (Rosetta Inpharmatics). All data were filtered to eliminate low-intensity values under 50 arbitrary units for both colors.

Tumor xenografts

For tumor establishment, 5×10^6 HL60 or 2.5×10^6 OCI-AML3 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 μ g, twice /week), the combination of DFO and VD or PBS as a vehicle control. The tumor growth was measured as previously described (Lepelletier et al., 2007).

Immunohistochemistry

Serial sections (3 μ 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% H₂O₂. Hematoxylin-eosin (HE) stained sections were used to evaluate cytomorphology and to detect apoptotic cells with condensed nuclei. Apoptosis was assessed by the TUNEL technique following the manufacturer's instructions (Roche). 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 (***).

BIBLIOGRAPHY

- Abe, E., C. Miyaura, H. Sakagami, M. Takeda, K. Konno, T. Yamazaki, S. Yoshiki, and T. Suda. 1981. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78:4990-4.
- Armand, P., H.T. Kim, C.S. Cutler, V.T. Ho, J. Koreth, E.P. Alyea, R.J. Soiffer, and J.H. Antin. 2007. Prognostic impact of elevated pretransplantation serum ferritin in patients undergoing myeloablative stem cell transplantation. *Blood.* 109:4586-8.
- Bastie, J.N., N. Balitrand, F. Guidez, I. Guillemot, J. Larghero, C. Calabresse, C. Chomienne, and L. Delva. 2004. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 transrepresses retinoic acid transcriptional activity via vitamin D receptor in myeloid cells. *Mol Endocrinol.* 18:2685-99.
- Bode, A.M., and Z. Dong. 2007. The functional contrariety of JNK. *Mol Carcinog.* 46:591-8.
- Buitrago, C.G., A.C. Ronda, A.R. de Boland, and R. Boland. 2006. MAP kinases p38 and JNK are activated by the steroid hormone 1alpha,25(OH)2-vitamin D3 in the C2C12 muscle cell line. *J Cell Biochem.* 97:698-708.
- 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.* 22:42-8.
- Caroline, L., F. Rosner, and P.J. Kozinn. 1969. Elevated serum iron, low unbound transferrin and candidiasis in acute leukemia. *Blood.* 34:441-51.
- Chaston, T.B., R.N. Watts, J. Yuan, and D.R. Richardson. 2004. Potent antitumor activity of novel iron chelators derived from di-2-pyridylketone isonicotinoyl hydrazone involves fenton-derived free radical generation. *Clin Cancer Res.* 10:7365-74.
- 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.* 317:1135-41.
- Chou, T.C. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev.* 58:621-81.
- Daniels, T.R., T. Delgado, G. Helguera, and M.L. Penichet. 2006a. The transferrin receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells. *Clin Immunol.* 121:159-76.
- Daniels, T.R., T. Delgado, J.A. Rodriguez, G. Helguera, and M.L. Penichet. 2006b. The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin Immunol.* 121:144-58.
- Davies, M.J. 2005. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta.* 1703:93-109.
- 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.
- Esposito, B.P., S. Epsztejn, W. Breuer, and Z.I. Cabantchik. 2002. A review of fluorescence methods for assessing labile iron in cells and biological fluids. *Anal Biochem.* 304:1-18.
- Faulk, W.P., B.L. Hsi, and P.J. Stevens. 1980. Transferrin and transferrin receptors in carcinoma of the breast. *Lancet.* 2:390-2.
- Fenton, R.H., F.B. Johnson, and L.E. Zimmerman. 1964. The Combined Use of Microincineration and the Prussian Blue Reaction for a More Sensitive Histochemical Demonstration of Iron. *J Histochem Cytochem.* 12:153-5.
- 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.* 89:619-20.
- Friedman, A.D. 2002. Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene.* 21:3377-90.

- Friedman, A.D. 2007. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene*. 26:6816-28.
- Frohling, S., C. Scholl, D.G. Gilliland, and R.L. Levine. 2005. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol*. 23:6285-95.
- 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*. 110:752-61.
- 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*. 36:539-45.
- Gemelli, C., C. Orlandi, T. Zanocco Marani, A. Martello, T. Vignudelli, F. Ferrari, M. Montanari, S. Parenti, A. Testa, A. Grande, and S. Ferrari. 2008. The vitamin D3/Hox-A10 pathway supports MafB function during the monocyte differentiation of human CD34+ hemopoietic progenitors. *J Immunol*. 181:5660-72.
- Gilliland, D.G., C.T. Jordan, and C.A. Felix. 2004. The molecular basis of leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:80-97.
- Graf, T., and T. Enver. 2009. Forcing cells to change lineages. *Nature*. 462:587-94.
- 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*. 176:2219-28.
- Hmama, Z., D. Nandan, L. Sly, K.L. Knutson, P. Herrera-Velit, and N.E. Reiner. 1999. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3)-induced myeloid cell differentiation is regulated by a vitamin D receptor-phosphatidylinositol 3-kinase signaling complex. *J Exp Med*. 190:1583-94.
- Hughes, P.J., E. Marcinkowska, E. Gocek, G.P. Studzinski, and G. Brown. 2009. Vitamin D(3)-driven signals for myeloid cell differentiation-Implications for differentiation therapy. *Leuk Res*.
- Ji, Y., and G.P. Studzinski. 2004. Retinoblastoma protein and CCAAT/enhancer-binding protein beta are required for 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced monocytic differentiation of HL60 cells. *Cancer Res*. 64:370-7.
- Johnson, G.L., and R. Lapadat. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 298:1911-2.
- Jurutka, P.W., J.C. Hsieh, S. Nakajima, C.A. Haussler, G.K. Whitfield, and M.R. Haussler. 1996. Human vitamin D receptor phosphorylation by casein kinase II at Ser-208 potentiates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:3519-24.
- Kalyanaraman, B. 2007. Iron signaling and oxidant damage. *Cardiovasc Toxicol*. 7:92-4.
- Kansas, G.S., M.J. Muirhead, and M.O. Dailey. 1990. Expression of the CD11/CD18, leukocyte adhesion molecule 1, and CD44 adhesion molecules during normal myeloid and erythroid differentiation in humans. *Blood*. 76:2483-92.
- Kelly, L.M., and D.G. Gilliland. 2002. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 3:179-98.
- Koeffler, H.P., T. Amatruda, N. Ikekawa, Y. Kobayashi, and H.F. DeLuca. 1984. Induction of macrophage differentiation of human normal and leukemic myeloid stem cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its fluorinated analogues. *Cancer Res*. 44:5624-8.
- Koeffler, H.P., N. Aslanian, and J. O'Kelly. 2005. Vitamin D(2) analog (Paricalcitol; Zemplar) for treatment of myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. 29:1259-62.
- 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*. 104:2967-75.
- 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*. 67:1145-54.

- 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]*. 157:363-71.
- Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25:402-8.
- 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*. 11:447-60.
- Lowenberg, B., J.R. Downing, and A. Burnett. 1999. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 341:1051-62.
- Lowenberg, B., G.J. Ossenkoppele, W. van Putten, H.C. Schouten, C. Graux, A. Ferrant, P. Sonneveld, J. Maertens, M. Jongen-Lavrencic, M. von Lilienfeld-Toal, B.J. Biemond, E. Vellenga, M. van Marwijk Kooy, L.F. Verdonck, J. Beck, H. Dohner, A. Gratwohl, T. Pabst, and G. Verhoef. 2009. High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 361:1235-48.
- Martindale, J.L., and N.J. Holbrook. 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*. 192:1-15.
- 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*. 194:417-25.
- 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*. 103:1838-45.
- Mueller, B.U., T. Pabst, M. Osato, N. Asou, L.M. Johansen, M.D. Minden, G. Behre, W. Hiddemann, Y. Ito, and D.G. Tenen. 2002. Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood*. 100:998-1007.
- Napier, I., P. Ponka, and D.R. Richardson. 2005. Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. *Blood*. 105:1867-74.
- Nasr, R., M.C. Guillemin, O. Ferhi, H. Soilihi, L. Peres, C. Berthier, P. Rousselot, M. Robledo-Sarmiento, V. Lallemand-Breitenbach, B. Gournel, D. Vitoux, P.P. Pandolfi, C. Rochette-Egly, J. Zhu, and H. de The. 2008. Eradication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells through PML-RARA degradation. *Nat Med*. 14:1333-42.
- Owusu-Ansah, E., and U. Banerjee. 2009. Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature*. 461:537-41.
- Owusu-Ansah, E., A. Yavari, S. Mandal, and U. Banerjee. 2008. Distinct mitochondrial retrograde signals control the G1-S cell cycle checkpoint. *Nat Genet*. 40:356-61.
- Porter, J., R. Galanello, G. Saglio, E.J. Neufeld, E. Vichinsky, M.D. Cappellini, N. Olivieri, A. Piga, M.J. Cunningham, D. Soulieres, N. Gattermann, G. Tchernaia, J. Maertens, P. Giardina, J. Kwiatkowski, G. Quarta, M. Jeng, G.L. Forni, M. Stadler, H. Cario, L. Debusscher, M. Della Porta, M. Cazzola, P. Greenberg, G. Alimena, B. Rabault, I. Gathmann, J.M. Ford, D. Alberti, and C. Rose. 2008. Relative response of patients with myelodysplastic syndromes and other transfusion-dependent anaemias to deferasirox (ICL670): a 1-yr prospective study. *Eur J Haematol*. 80:168-76.
- Ravandi, F., A.K. Burnett, E.D. Agura, and H.M. Kantarjian. 2007. Progress in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer*. 110:1900-10.
- 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*. 22:915-31.

- 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.* 54:685-9.
- 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.*
- Roumier, C., S. Lejeune-Dumoulin, A. Renneville, A.S. Goethgeluck, N. Philippe, P. Fenaux, and C. Preudhomme. 2006. Cooperation of activating Ras/rtk signal transduction pathway mutations and inactivating myeloid differentiation gene mutations in M0 AML: a study of 45 patients. *Leukemia.* 20:433-6.
- Sattler, M., T. Winkler, S. Verma, C.H. Byrne, G. Shrikhande, R. Salgia, and J.D. Griffin. 1999. Hematopoietic growth factors signal through the formation of reactive oxygen species. *Blood.* 93:2928-35.
- Sieweke, M.H., and T. Graf. 1998. A transcription factor party during blood cell differentiation. *Curr Opin Genet Dev.* 8:545-51.
- 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.
- Srivastava, M.D., and J.L. Ambrus. 2004. Effect of 1,25(OH)₂ Vitamin D₃ analogs on differentiation induction and cytokine modulation in blasts from acute myeloid leukemia patients. *Leuk Lymphoma.* 45:2119-26.
- 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.* 99:1197-204.
- Tothova, Z., and D.G. Gilliland. 2007. FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system. *Cell Stem Cell.* 1:140-52.
- Tothova, Z., R. Kollipara, B.J. Huntly, B.H. Lee, D.H. Castrillon, D.E. Cullen, E.P. McDowell, S. Lazo-Kallanian, I.R. Williams, C. Sears, S.A. Armstrong, E. Passegue, R.A. DePinho, and D.G. Gilliland. 2007. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell.* 128:325-39.
- Trowbridge, I.S., and D.L. Domingo. 1981. Anti-transferrin receptor monoclonal antibody and toxin-antibody conjugates affect growth of human tumour cells. *Nature.* 294:171-3.
- Trowbridge, I.S., and D.A. Shackelford. 1986. Structure and function of transferrin receptors and their relationship to cell growth. *Biochem Soc Symp.* 51:117-29.
- 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 D₃. *J Cell Biochem.* 89:1087-101.
- Wang, Z.Y., and Z. Chen. 2008. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood.* 111:2505-15.
- Waxman, S. 2000. Differentiation therapy in acute myelogenous leukemia (non-APL). *Leukemia.* 14:491-6.
- Whitmarsh, A.J., and R.J. Davis. 1999. Signal transduction by MAP kinases: regulation by phosphorylation-dependent switches. *Sci STKE.* 1999:PE1.
- 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.* 103:14901-6.
- Zhu, J., V. Lallemand-Breitenbach, and H. de The. 2001. Pathways of retinoic acid- or arsenic trioxide-induced PML/RAR α catabolism, role of oncogene degradation in disease remission. *Oncogene.* 20:7257-65.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

SUPPLEMENTARY METHODS

Cord blood cell cultures and methylcellulose colony-forming assays

CD34⁺ 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). A24 (10 µg/mL), DFO (5 µM) or DFX (3 µM) were added iteratively every 3 days in the culture medium.

For colony-forming assays, 1×10^3 CD34⁺ 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). At day 14, colonies containing more than 50 cells were counted and classified as granulocyte colony (CFU-G), monocyte-macrophage colony (CFU-M), mixed granulocyte-monocyte colony (CFU-GM) or erythroid colony (CFU-E). The colonies were counted by standard criteria in 60-mm gridded scoring dishes with cross-marks (Stem Cell Technologies) under an inverted microscope.

Analysis of cellular differentiation and apoptosis

Cellular differentiation was evaluated by morphology with May Grünwald Giemsa (MGG) staining. Esterase activity was detected using the leucognost-est kit (Merck). The expression of CD11b (IM2581U, Beckman Coulter) and CD14 (A07765, Beckman Coulter) were evaluated 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

All experiments were made on cells after 12h of serum starvation to avoid detection of constitutive phosphorylations. Whole cell extracts were prepared as described previously (Amir-Moazami et al., 2008). Briefly, cell pellets (1×10^7 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 Na₃VO₄, 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 bromophenol 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), p-p38 (#4631) (all from Cell

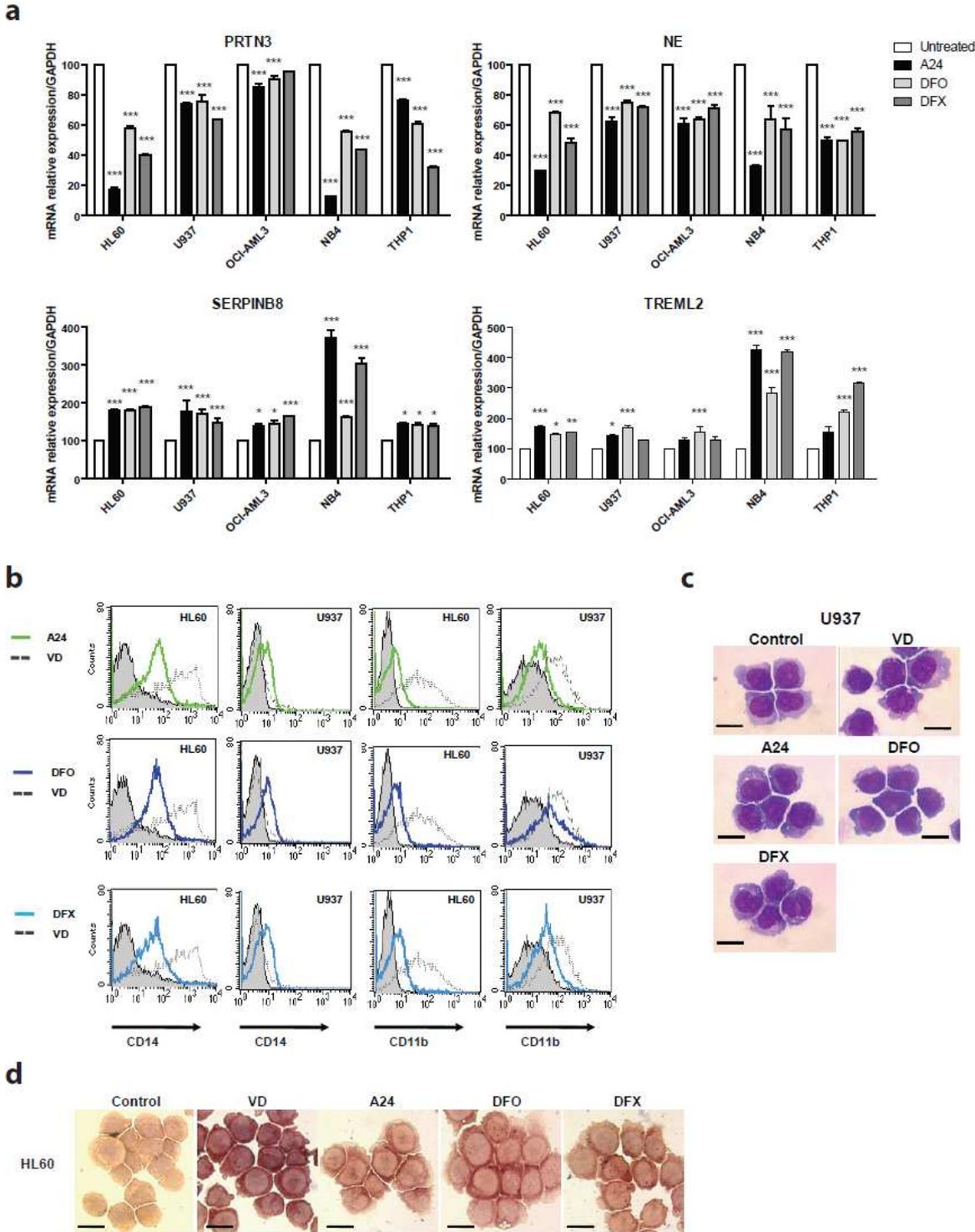
Signaling, Beverly, MA or p-VDR (Ab79311, Abcam) antibody. The membranes were stripped, dried and probed with an antibody against total ERK (#9102 Cell Signaling), VDR (Ab12129, Abcam) or HSC70 (sc-71270, SantaCruz Biotechnology). The protein bands were visualized using a chemiluminescence system.

Analysis of combined drug effects

CD14 expression evaluated by flow cytometry was used to evaluate the combined efficacy of deferoxamine, vitamin D and mAb A24. In each experiment, HL60 cells were treated with serial dilutions of each agent individually and with a fixed ratio of both agents simultaneously. The results were analyzed using the median-effect/combination index isobologram method of Chou and Talalay (Chou and Talalay, 1984). $F(a)$ is the fraction of cells affected (i.e. CD14⁺) and $f(u)$ is the fraction of cells unaffected (i.e. CD14⁻). F is the ratio $f(a)/f(u)$ and D is the drug concentration. $\log(F)$ was plotted against $\log(D)$. The dose response is displayed as a linear regression line and the X-intercept correspond to the $\log(IC_{50})$. The combination index (CI) was defined as follows : $CI = (D)_1/(D_x)_1 + (D)_2/(D_x)_2$ where $(D_x)_1$ and $(D_x)_2$ are the doses required to achieve a given effect level for each drug, i.e. a specified value of $f(a)$. $(D)_1$ and $(D)_2$ are the doses of each drug in a given mixture which gives the same $f(a)$. When CI values are 1, <1 or >1, it may be concluded that summation, synergism or antagonism respectively have been observed at the particular level examined. The CI was calculated based on the conservation assumption of mutually nonexclusive drug interactions.

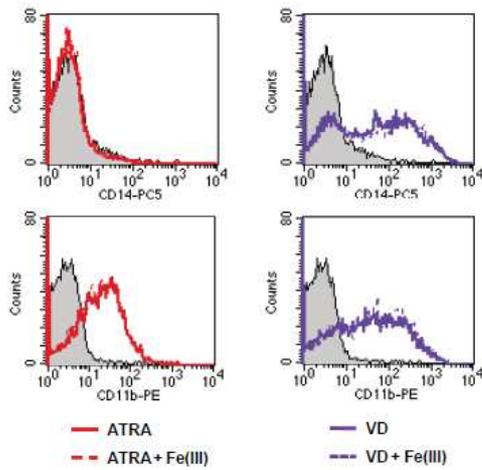
SUPPLEMENTARY FIGURES

Callens *et al.* Supplementary Figure 1



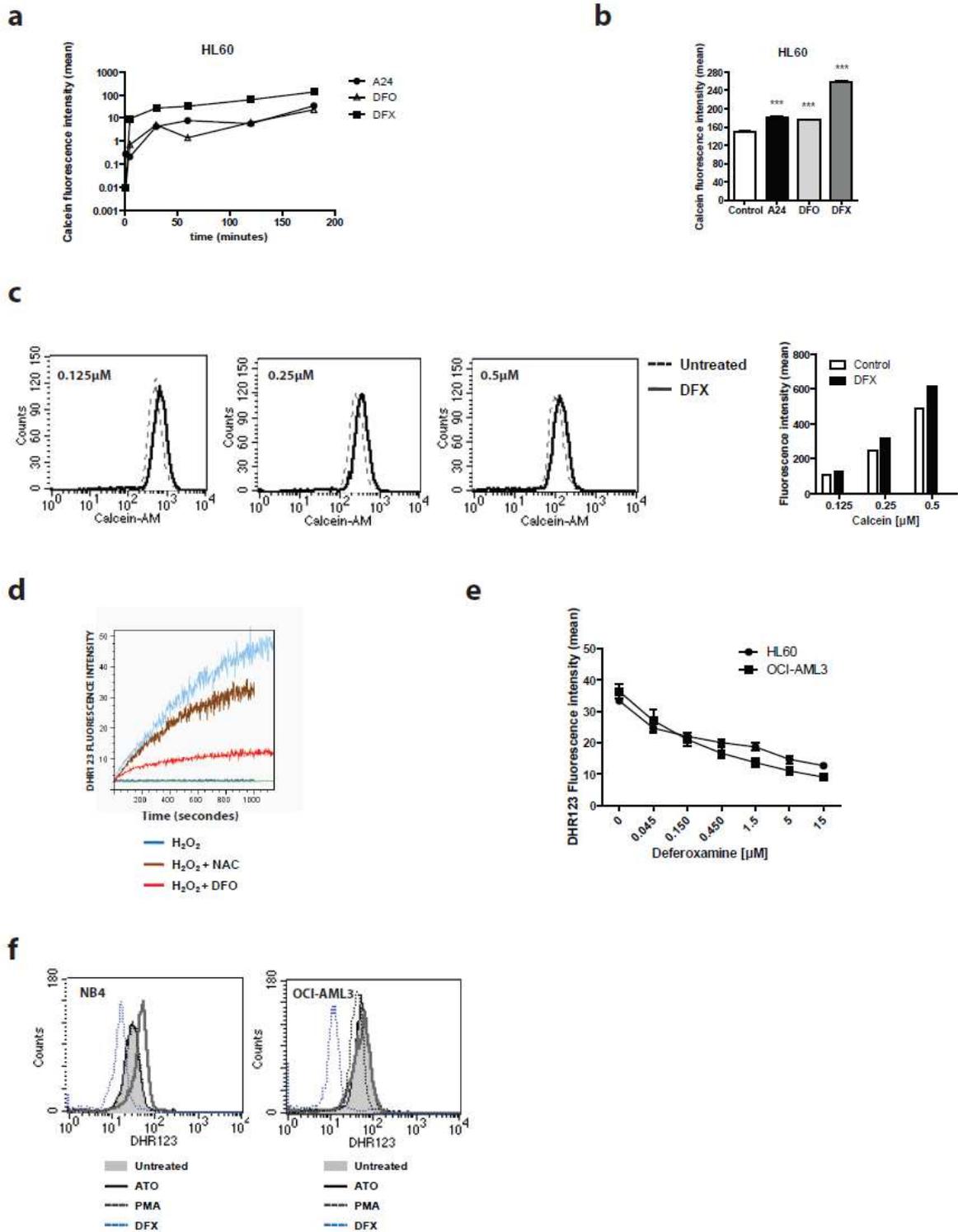
Supplementary Figure 1. *Iron deprivation induces morphological and phenotypical modifications of monocytic cells related to cellular differentiation.*

HL60 and U937 cells were cultured in the presence of A24 (10 µg/ml), DFO (5 µM), DFX (3 µM) or VD (250 nM) for 72 h. **(a)** *PRTN3*, *NE*, *SERPINB8* and *TREML2* mRNA level evaluated by quantitative RT-PCR and normalized to *GAPDH* mRNA in HL60, U937, OCI-AML3, NB4 and THP1 cell lines treated for 48 h with the indicated agents (A24, 10 µg/ml; DFO, 5 µM or DFX, 3 µM; mean ± SEM, *n*=4). **(b)** Flow cytometry 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. **(c)** MGG-stained cytopins. 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). Scale bar, 10µm. Magnification: x 630. **(d)** non-specific esterase (NSE)-stained cytopins of HL60 cell line treated for 72 with indicated agents (VD, 250 nM; A24, 10 µg/ml; DFO, 5 µM or DFX, 3 µM). Scale bar, 10µm, Magnification X630.

a

Supplementary figure 2. Cellular differentiation induced by VD and ATRA is not iron dependent

(a) CD14 expression in HL60 cells treated with ATRA (continuous bold red line) or VD (continuous bold purple line) in the presence or absence of 5 μ M FeCl₃ (discontinuous thin line) for 72 h. The filled histograms represent staining with the isotype control antibody. One representative experiment of three experiments is shown.

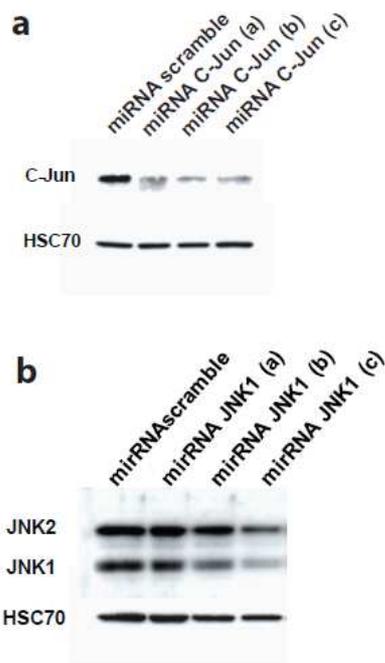


Supplementary figure 3. Detection of intracellular labile iron pool (LIP) and ROS in AML cells

(a) Time-course analysis of decreased LIP in cells treated with iron chelators. HL60 cells were labeled with calcein-AM, washed and treated or not with A24 (10 μ g/ml), DFX (3 μ M) and DFO (5 μ M) for the indicated periods of time. Increased calcein-AM fluorescence indicated decreasing LIP in treated cells relative to untreated cells. **(b)** Calcein-AM fluorescence intensity (mean fluorescence) of HL60 cells treated or not with A24 (10 μ g/ml), DFX (3 μ M) and DFO (5 μ M) for 90 minutes. **(c)** Dose-response studies of calcein-AM labeling on HL60 cells exposed or not to the iron chelator DFX (3 μ M).

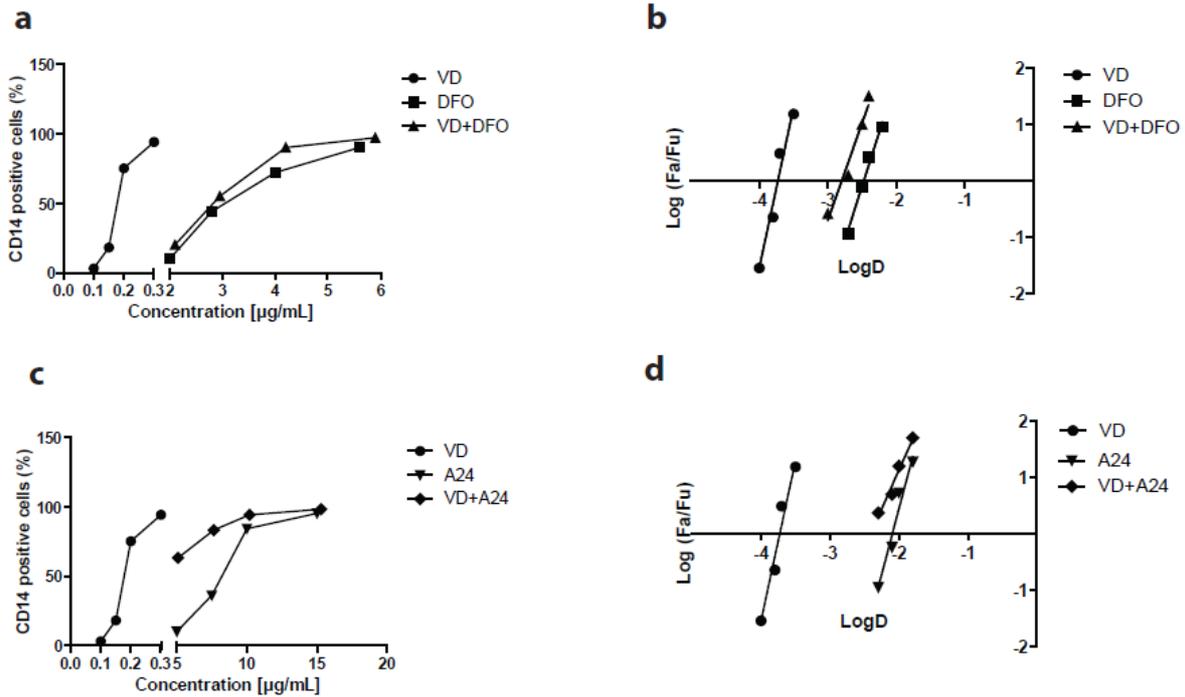
Long-lasting effect of iron chelators for inhibition of ROS production in HL60 cells

(d) Time course flow cytometry analysis of ROS production. Cells were treated or not overnight in the presence of DFO (5 μ M) or 1mM NAC. Cells were then labeled with DHR123 and ROS production was evaluated by exposure of cells to 5 μ M H2O₂. Control cells (blue), NAC treated cells (brown) and DFO treated cells (red). One representative experiment is shown. **(e)** HL60 and OCI-AML3 cells were treated with increasing concentrations of DFO for 16h. Cells were then labeled with DHR123 for 30 minutes at 37 $^{\circ}$ C and relative ROS levels (MFI) were evaluated by flow cytometry). **(f)** Relative ROS levels in NB4 and OCI-AML3 cells treated for 16h with ATO (5 μ M), PMA (5 μ M and DFX (3 μ M).



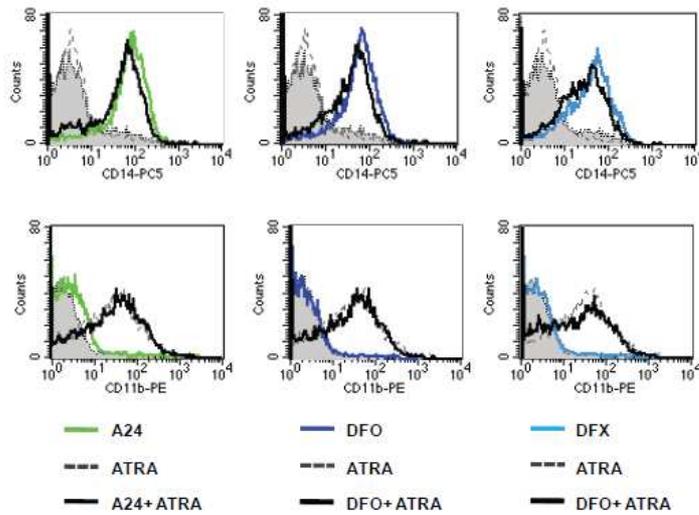
Supplementary Figure 4. Efficacy of micro RNA constructs targeting c-JUN, JNK1 and JNK2.

(a) CHO cells were transfected with miRNA scramble or miRNA targeting C-Jun as indicated. Three different constructs against C-Jun (a, b and c) were tested. Whole-cell extracts were made 24h after transfection and analyzed by immunoblot, demonstrating decreased expression of C-Jun. HSC70 was used as loading control. One representative experiment is shown. **(b)** CHO cells were transfected with miRNA scramble or targeting JNK1 as indicated. Three different constructs against JNK1 (a, b and c) were tested. Whole-cell extracts were made 24h after transfection and analyzed by immunoblot, demonstrating the downregulation of JNK1. HSC70 was used as loading control. One representative experiment is shown.



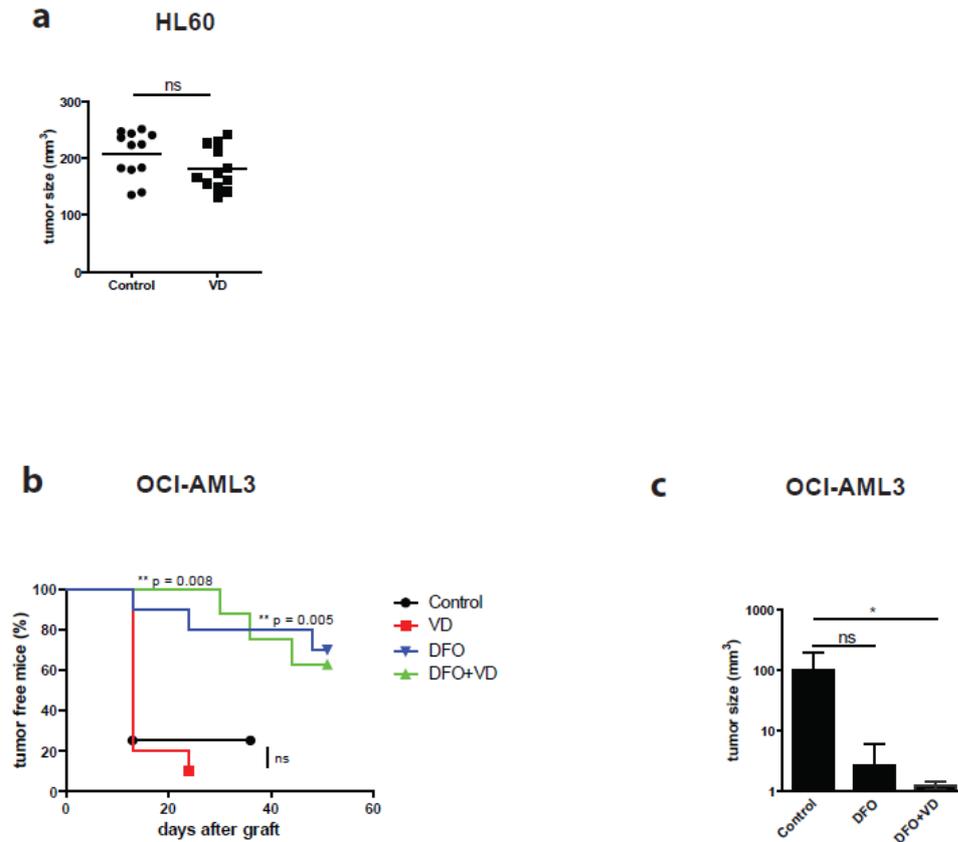
Supplementary Figure 5. Determination of the Synergic vs additive effect of the combined DFO and VD, and A24 and VD therapies on cell differentiation.

(a) HL60 cells were treated 72h with serial concentrations of DFO alone, VD alone or the combination at a fixed ratio (1:20 ratio of VD and DFO). CD14 expression was evaluated by flow cytometry. One representative experiment is shown. **(b)** The results are plotted by the median effect plot, i.e. $\log(Fa/Fu)$ with respect to $\log(D)$ for VD, DFO and the combination as described in material and methods section. The dose response is displayed as a linear regression line. One representative experiment is shown **(c)** HL60 cells were treated 72h with serial concentrations of A24 alone, VD alone or the combination at a fixed ratio (1:50 ratio of VD and A24). CD14 expression was evaluated by flow cytometry. One representative experiment is shown **(d)** The results are plotted by the median effect plot, i.e. $\log(Fa/Fu)$ with respect to $\log(D)$ for VD, A24 and the combination. The dose response is displayed as a linear regression line. One representative experiment is shown.

a

Supplementary figure 6. A24 and iron chelators do not synergize with ATRA to induce differentiation

(a) Flow cytometric analysis of CD14 and CD11b expression on HL60 cells treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ A24, 5 μM DFO or 3 μM DFX (continuous thin line), with 1 μM ATRA (discontinuous thin line) or a combination of ATRA 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.



Supplementary figure 7. Anti-tumor effect of iron deprivation combined with Vitamin D in Nude mice xenografted with AML cell lines

(a) Tumor size was measured at day 25 in HL60 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). **(b)** Kaplan-Meier plot of the percentage of tumor-free mice among mice treated with vehicle (Control), VD ($1\mu\text{g}$ intraperitoneally, twice per week), DFO (20 mg/day intraperitoneally, five times/week) or the combination of VD+DFO after subcutaneous xenograft with OCI-AML3 cells. The p value was determined using the log rank test. **(c)** Tumor size measured at day 24 in OCI-AML3 xenografted mice. (Mean \pm SD, $n=8$ in the control group, $n=10$ in the DFO group and $n=10$ in the DFO+VD group).

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	KDEL1	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 (/mm3)	% 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
UBE2E1	NM_003341
PLD4	NM_138790
AK026140	AK026140
MS4A6A	NM_022349
MS4A6A	NM_152852
CSTF2T	NM_015235
unknown	A_32_P167111

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

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
HOXA10	5'- ggccccttccgagagcagca -3'	5'- tggacgctgctgctaatactc -3'
MAFB	5'- atggagatgtcaacgactt -3'	5'- cctcgagggtgtgtcttctgt -3'
EGR1	5'- gagcagccctacgagcacct -3'	5'- tcatgctcactaggccactg -3'
C-JUN	5'-ccccagcggtatctatatggaa -3'	5'-gctgtccctctccactgcaa -3'
C-FOS	5'-atgagccttctctgactcg -3'	5'-acgcacagataaggctctcc -3'
VDR	5'-ctgaccctggagactttgac-3'	5'-ttcctctgcacttctctatc-3'
Cathelicidin	5'- gcagtcaccagaggattgtgac -3'	5'-caccgcttcaccagccc -3'
CYP24A	5'-tggcttcaggagaaggaaaa -3'	5'-accagggctcctgaggtag -3'
PRTN3	5'-aggagctcaatgtcaccgt-3'	5'-atgcatcacagatccaggg-3'
NE	5'-cgtgcagcgcctctcgaa-3'	5'-acgtggcggtgatgggtg-3'
SERPIN8	5'-cagaagttctataggcagagctgga-3'	5'-tgcttctgcacttctcagtgtct-3'
TREML2	5'-tctatgggttttgaagaagagaca-3'	5'-tccaggtgggtcacgtgtag-3'

3. Discussion des résultats et perspectives

L'ensemble de ces résultats indiquent que l'homéostasie du fer intervient dans la différenciation myélo-monocytaire en favorisant son orientation vers le lignage monocytaire et agit en synergie avec la vitamine D. Les études de transcriptome sur la lignée HL60 nous ont orientés dans un premier temps vers l'implication de la voie de signalisation des MAPkinases dans ce phénomène, ce que nous avons confirmé par les expériences de surexpression et d'extinction de JNK. Concernant la synergie avec la vitamine D, nous avons montré ensuite que les chélateurs stabilisaient le VDR par sa phosphorylation et amplifiaient le signal médié par le VDR. Il manquait cependant un « déclencheur » commun à ces deux voies de signalisation, que nous avons identifié assez tardivement : les ROS. En effet, la plupart des expériences *princeps* de ce travail ont été réalisées avec la lignée HL60, dont les modifications du niveau de ROS sont très faibles après privation en fer, si bien que cette piste ne nous avait pas semblée majeure dans un premier temps. Ce n'est qu'en répétant les expériences sur d'autres lignées leucémiques que le rôle des ROS nous est apparu essentiel. Curieusement d'ailleurs, c'est la lignée leucémique promyélocytaire NB4 qui est la plus sensible aux variations de ROS en réponse à la privation en fer et dont nous observons, comme pour HL60, la différenciation. Les leucémies promyélocytaires possèdent déjà leur traitement différenciant dont l'efficacité n'est plus à démontrer, c'est pourquoi nous avons exclu dans un premier temps ce sous-type de leucémies de notre travail. Avec ces résultats, il nous semble désormais qu'il serait intéressant d'étudier les effets de la privation en fer sur les leucémies promyélocytaires. L'avantage de cette pathologie est que les modèles murins reproduisant la maladie humaine sont déjà bien établis et validés.

Nous avons montré que la privation en fer agit en synergie avec la vitamine D pour induire la différenciation monocytaire des blastes leucémiques, ce qui permet d'utiliser la vitamine D à des doses où elle n'induit pas d'effets secondaires, notamment d'hypercalcémie. Ce travail pourrait donc remettre au goût du jour cette drogue dont les propriétés différenciantes ont été largement démontrées mais dont l'utilisation clinique a toujours posé problème. Nos résultats indiquent que la synergie entre la privation en fer et la vitamine D implique l'activation des MAPkinases, essentiellement JNK, et la signalisation du VDR (**figure 24**). Cependant, nous ne savons pas exactement à quelle étape a lieu la convergence de ces deux signaux et s'il n'existe pas une hiérarchisation temporelle de ces signaux. En effet, nous avons démontré que la privation en fer active les MAPkinases et augmente l'expression des facteurs de transcription C-Jun et C-Fos. Ces derniers forment des hétérodimères qui vont aller se fixer sur les sites AP1 présents dans les promoteurs des gènes codant le VDR et CD14. De plus, il existe dans la région promotrice du CD14 un site de fixation pour le facteur de transcription Sp1 avec lequel pourrait interagir la vitamine D^{288,464} (expliquant d'ailleurs

comment la vitamine D augmente l'expression du CD14 alors même qu'il n'y a pas de VDRE dans la région promotrice du gène codant CD14). La synergie d'augmentation d'expression du CD14 proviendrait donc de l'activation des sites AP1 et des sites Sp1. D'autre part, il a également été décrit un site AP1 dans la région promotrice du VDR. En activant les MAPkinases, la privation en fer peut donc augmenter la transcription du VDR, renforçant l'idée d'une synergie avec la vitamine D, d'autant plus que le VDR est ensuite stabilisé par sa phosphorylation, augmentée elle-aussi par la privation en fer.

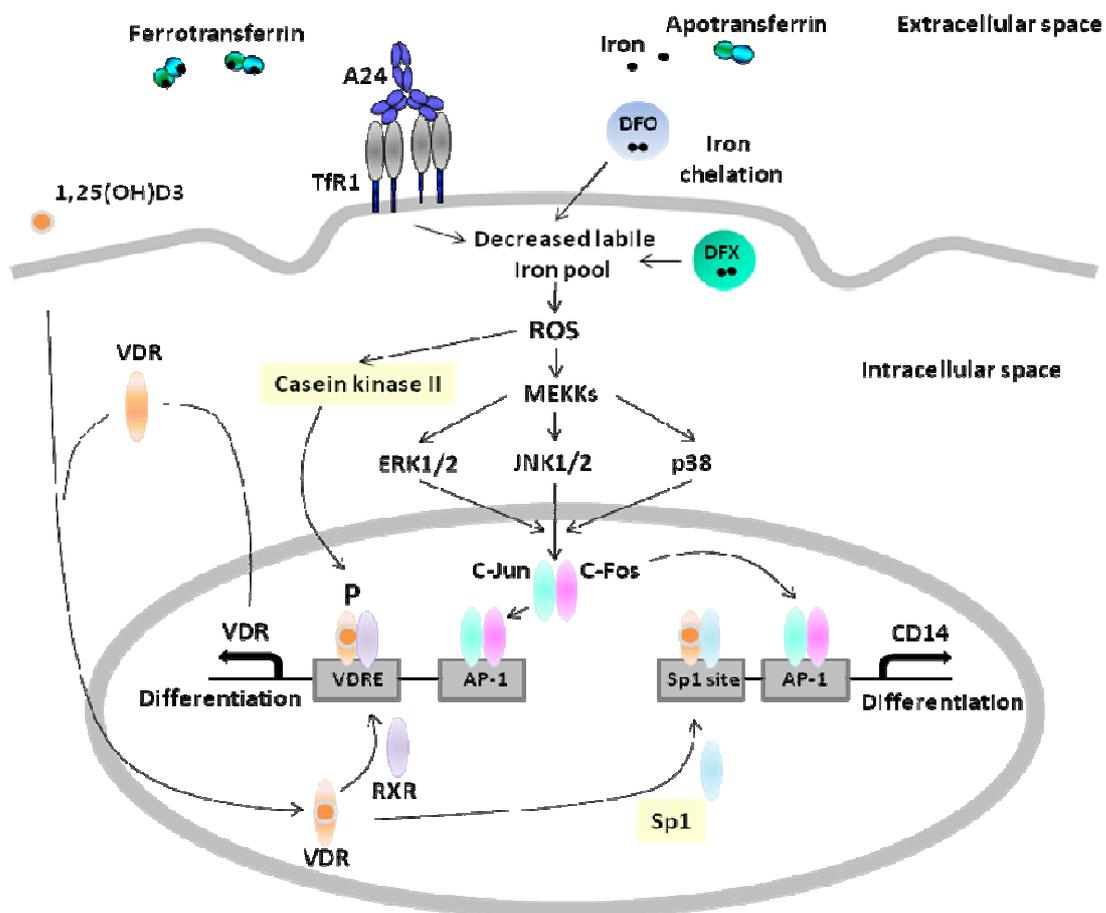


Figure 24 : Voies de signalisation impliquées dans la différenciation induite par la privation en fer en association avec la vitamine D (effets à court terme). Les interventions de la caséine kinase II et du facteur de transcription Sp1 n'ont pas été étudiées dans ce travail.

Il faut noter toutefois que ces effets attribués à la privation en fer résultent en fait du pic de ROS à court terme que provoquent les chélateurs de fer. Il semblerait au contraire que la vitamine D agit comme un antioxydant pour induire la différenciation⁴⁶⁵. A long terme, la privation en fer diminue le pool de fer intracellulaire et s'oppose à la formation des ROS, comme la vitamine D. Il nous reste donc à étudier le statut oxydatif global des cellules leucémiques traitées par l'association des chélateurs de fer avec la vitamine D et ses variations pendant la durée du traitement. Il est possible que la privation en fer, même en présence de vitamine D, déclenche très rapidement un pic de ROS, puis qu'elle agisse comme un antioxydant en diminuant le pool de fer intracellulaire et qu'elle finisse donc par coopérer avec les effets antioxydants et pro-différenciants de la vitamine D.

Une partie minoritaire de ce travail a été réalisée sur les progéniteurs issus de sang de cordon et nous a permis de montrer que l'homéostasie du fer jouait également un rôle dans la différenciation myéloïde non pathologique. Dans ces expériences, nous constatons que la privation en fer oriente l'engagement des progéniteurs vers le lignage monocytaire au détriment du lignage granuleux. Pour compléter cet aspect du travail, il nous semble important de déterminer à quel niveau la privation en fer, et toutes les conséquences que nous avons observées sur les lignées leucémiques, interviennent dans la différenciation hématopoïétique. En effet, nous ne savons pas si ce sont les cellules souches, les progéniteurs érythro-mégacaryocytaire-myéloïde commun ou les progéniteurs myélo-monocytaires qui sont atteints par la privation en fer, ni même si toutes ces populations ne peuvent pas être atteintes en même temps. Nous nous demandons également si la privation en fer pourrait atteindre les cellules souches leucémiques. L'ampleur du travail pour répondre à ces questions ne nous a pas permis d'avancer sur ce sujet en même temps que nous étudions la différenciation leucémique. De plus, nous nous sommes heurtés à un problème majeur : suite à des problèmes récurrents de contaminations virale et parasitaire de l'animalerie du laboratoire, tout élevage de souris immunodéficientes de type NOD/SCID ou NOG a été impossible. Il est évident que des modèles de xéno greffes chez ces souris sont nécessaires pour répondre à ces questions et nous ne désespérons pas de pouvoir commencer des expériences *in vivo* très prochainement.

DISCUSSION GENERALE

1. Conséquences cellulaires de la perturbation de l'homéostasie du fer

Du fait d'un taux de rechute important et d'une survie qui s'en trouve écourtée, l'amélioration des traitements contre les LAM reste un enjeu actuel majeur. La leucémogénèse des LAM est de mieux en mieux connue ce qui a permis la mise en œuvre de nombreux essais cliniques pour tester l'efficacité de nouvelles thérapeutiques ciblées. Pourtant, les études de transcriptome, de méthylome des LAM et plus récemment le séquençage du génome entier nous montrent finalement que ce que nous connaissons de la biologie des LAM n'est qu'une infime partie d'un processus multi-oncogénique, si bien que les pistes thérapeutiques non explorées sont encore très nombreuses.

1.1. Propriétés antitumorales de la privation en fer

Notre travail a permis de démontrer les propriétés anti-leucémiques de notre anticorps A24 ciblant le RTf. Cet anticorps est donc capable d'inhiber la prolifération des cellules malignes dans plusieurs types d'hémopathie touchant le lignage T comme l'ATLL, le lignage B comme le lymphome du manteau et le lignage myéloïde comme les LAM. Etant donné que les cellules tumorales expriment davantage de RTf que leurs homologues non tumorales, A24 peut donc être considéré comme une nouvelle approche antitumorale ciblée. Cet anticorps est encore assez éloigné d'un usage thérapeutique mais ces résultats et ceux des études de sécurité d'administration réalisés chez le macaque sont tout à fait encourageants pour le développement d'un anticorps A24 humanisé. Il est clair qu'à l'heure actuelle, l'utilisation des chélateurs en thérapie anti-cancéreuse semble beaucoup plus avancée.

Depuis les années 1990, l'équipe de Richardson avait décrit les propriétés anti-tumorales des chélateurs de fer dans plusieurs tumeurs solides. Ils avaient ainsi montré que ces propriétés n'étaient pas uniquement attribuables à la privation en fer mais plutôt étroitement reliées au potentiel redox de ces molécules. Depuis, ce laboratoire a développé de nombreuses nouvelles classes chimiques de chélateurs améliorant sans cesse leurs propriétés anti-tumorales⁴⁶⁶. Il y a à peine quelques années, le chélateur de référence était encore le DFO dont l'administration en perfusion sous-cutanée est particulièrement contraignante. Depuis 2005, il semble que l'arrivée sur le marché de l'EXJADE®, chélateur bien plus puissant que le DFO et administrable par voie orale, a donné un nouvel essor à la recherche de nouvelles

applications thérapeutiques des chélateurs de fer. Les essais cliniques utilisant les chélateurs de fer dans le cancer restent cependant pour l'instant peu nombreux. En novembre 2009, Novartis a débuté un essai clinique de phase III aux Etats-Unis (essai TELESTO) comparant le deferasirox à un placebo dans le traitement des MDS de bas grade et de grade intermédiaire avec surcharge en fer. L'objectif primaire de l'essai TELESTO est d'évaluer la survie sans événement chez environ 700 patients. Il semble qu'il n'existe aucun essai similaire en Europe que ce soit dans le traitement des tumeurs solides ou des hémopathies malignes.

Notre étude a montré que la privation en fer induite soit par A24 soit par les chélateurs provoque l'arrêt de prolifération et l'apoptose des cellules de LAM. En 2009, une équipe japonaise a publié ses résultats sur les effets du DFX sur 3 lignées leucémiques, HL60, U937 et K562, et sur les blastes primaires issus de 4 patients⁴⁶⁷. De manière similaire à notre étude, cette équipe montre que le DFX induit l'apoptose des cellules de LAM. De plus, l'administration de DFX à des souris nude xéno greffées avec la lignée U937 diminue la taille des tumeurs mais ne prolonge pas la survie des souris de manière significative, ce qui est totalement en accord avec ce que nous montrons en utilisant le DFO et la lignée HL60. Dans cette étude, le DFX semble augmenter l'expression de REDD1, qui inhibe la phosphorylation de mTOR et de p70S6 kinase (S6K). La voie mTOR est activée de manière constitutive dans les LAM où elle favorise la prolifération. Il est donc très intéressant de constater que le DFX permet d'inhiber cette voie. Il faut cependant noter que dans cet article, aucune expérience ne prouve que l'arrêt de prolifération des cellules de LAM par le DFX est du à l'inhibition de mTOR. D'autre part, les résultats *in vitro* de cette équipe sont surprenants car obtenus à des concentrations de chélateur 10 fois supérieures à celles que nous utilisons. Nous n'avons pas regardé dans notre modèle si A24, DFO ou DFX inhibent la phosphorylation de mTOR et de S6K. Plusieurs publications ont montré l'intérêt de cibler cette voie dans les LAM en insistant sur le fait que tout l'axe PI3K/AKT/mTOR doit être inhibé pour éviter d'activer des voies de signalisation alternative⁴⁶⁸. En effet, la rapamycine qui inhibe uniquement mTORC1 a donné des résultats assez décevants car son effet était contrecarré, entre-autre, par l'activation plus importante de PI3K par une boucle de régulation passant par IGF1⁴⁶⁹. Récemment, la même équipe a montré que la voie mTOR pouvait également être activée par les Pim kinases⁴⁷⁰. De plus, dans une publication récente, il a été montré que la vitamine D induit la différenciation des cellules HL60 en diminuant l'expression d'AKT et les interactions AKT/raf-1⁴⁷¹. Il s'en suit alors l'activation de la voie de signalisation Raf/MEK/ERK/MAPK dont le rôle dans l'induction de la différenciation n'est plus à démontrer. Il serait intéressant d'étudier les effets précis des chélateurs et de la vitamine D sur l'axe PI3K/AKT/mTOR pour renforcer l'intérêt thérapeutique de cette association dans les LAM.

1.2.Privation en fer et différenciation cellulaire

Il y a quelques années, l'équipe de Schwarzer a montré que REDD1 est un gène de réponse au stress dont l'expression est fortement induite par l'hypoxie après activation de la voie PI3kinase (phosphatidylinositol-3-kinase)⁴⁷². Il n'est donc pas étonnant que le DFX augmente l'expression de REDD1 puisque les chélateurs miment l'hypoxie. En effet, le fer est indispensable au bon fonctionnement des enzymes qui hydroxylent HIF-1 α et l'orientent vers la dégradation par le protéasome. En présence de chélateur, le fonctionnement de ces enzymes est altéré, HIF-1 α n'est plus dégradé et donc sa concentration cellulaire augmente. HIF-1 α est un facteur de transcription dont l'expression est étroitement régulée par l'oxygène. Il forme avec HIF- β , dont l'expression est constitutive, un hétérodimère qui va permettre aux cellules de s'adapter à l'hypoxie en régulant les gènes impliqués dans le métabolisme du glucose, la prolifération, le pouvoir métastatique et l'angiogénèse. Dans la plupart des modèles de tumeurs solides, l'expression de HIF est délétère car la voie HIF favorise la croissance tumorale et son inhibition provoque la suppression de la tumeur. En oncologie, des taux élevés de HIF chez les patients cancéreux sont d'ailleurs associés à un mauvais pronostic⁴⁷³. L'augmentation de HIF-1 α provoquée par les chélateurs pourrait donc être délétère en situation tumorale. Pourtant, la plupart des études utilisant les chélateurs de fer montrent que leurs propriétés anti-tumorales dues à l'inhibition de la ribonucléotide réductase indispensable à la synthèse d'ADN l'emportent sur leurs propriétés pro-prolifératives et pro-angiogéniques puisqu'une réduction tumorale est observée⁴⁶⁶.

Dans les leucémies, l'équipe de Chen GQ, essentiellement, a réalisé plusieurs travaux étudiant les conséquences de l'augmentation de HIF après exposition de cellules leucémiques au DFO ou au chlorure de cobalt (CoCl₂). Initialement, cette équipe a montré que ces deux drogues induisent, à forte concentration, l'apoptose des lignées leucémiques U937 et NB4, objectivée par la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial, l'activation des caspases 3 et 8 et le clivage de la protéine anti-apoptotique Mcl-1⁴⁷⁴. Cette même équipe a montré qu'à faible concentration le DFO induit la différenciation des lignées U937 et NB4. Cette différenciation est dépendante de HIF puisque la surexpression de HIF par transfection dans la lignée U937 augmente l'expression du CD11b et la capacité de réduction du bleu de nitrazolium. En 2005, ils avaient déjà observé que le DFO peut agir en synergie avec le trioxyde d'arsenic pour induire la différenciation de NB4 objectivée par l'expression de CD11b sans capacité à réduire le bleu de nitrazolium⁴⁷⁵. Ils remarquaient d'ailleurs que l'association CoCl₂ et As₂O₃ était beaucoup plus efficace que l'association DFO et As₂O₃ pour induire la différenciation granuleuse. Ils constataient aussi que l'association As₂O₃ et DFO ou CoCl₂ était incapable d'induire l'augmentation de HIF et donc la différenciation de la lignée U937, sauf si cette lignée était transfectée avec le transcrit de fusion PML-RARA. Ces observations vont toutes dans le sens d'une différenciation granuleuse puisque les auteurs regardent l'expression du CD11b et la réduction du bleu de

nitrazolium. De même, il faut remarquer que la lignée U937 ne devient sensible à la différenciation que lorsqu'elle exprime le transcrit PML-RARA qui va l'orienter vers la différenciation granuleuse. Plus récemment, ils ont montré que la surexpression de HIF par transfection dans les lignées NB4 et U937 permet de voir une synergie de différenciation avec l'ATRA⁴⁷⁶ mais ils n'ont pas réalisé d'expérience utilisant le DFO pour induire HIF en association avec l'ATRA. Dans notre étude, l'association du DFO ou du DFX avec l'ATRA n'induit pas de synergie de différenciation granuleuse dans la lignée HL60. Il semble au contraire que la privation en fer s'oppose à la différenciation granuleuse en diminuant l'expression du CD11b induite par l'ATRA. A l'opposé, nous montrons que la privation en fer associée à la vitamine D favorise la différenciation monocytaire de la lignée HL60 et même de la lignée NB4 pourtant vouée à se différencier en neutrophiles matures. Nous pensons donc que l'induction de HIF est un facteur déterminant pour la différenciation granuleuse dans un environnement propice à cette différenciation (lignée NB4 déterminée vers le lignage granuleux, lignée U937 orientée vers le lignage granuleux par surexpression du transcrit PML-RARA) mais qu'il n'est probablement pas le responsable unique et direct de la différenciation monocytaire que nous observons. C'est pourquoi nous avons orienté nos recherches vers un mécanisme différent de l'induction de HIF pouvant expliquer les effets des chélateurs de fer sur la différenciation monocytaire.

1.3. Les ROS dans l'hématopoïèse

Les chélateurs possèdent des propriétés antiprolifératives dues à leur capacité à inhiber la ribonucléotide réductase mais également à la production de ROS. Nous avons vu dans l'introduction que l'état oxydatif des cellules est un équilibre précaire où les ROS sont naturellement produits et pris en charge par différents systèmes enzymatiques afin d'être éliminés. Leur effet délétère n'apparaît que lorsqu'ils sont produits en excès et dépassent la capacité des cellules à les prendre en charge. D. Richardson a bien décrit que les propriétés pro-apoptotiques des chélateurs de fer ne sont pas corrélées à leur plus grande capacité à chélater le fer. D'ailleurs, *in vitro*, la triapine possède une grande capacité anti-proliférative alors que cette molécule est un chélateur médiocre. La même équipe a montré que les analogues de PKIH ont les mêmes propriétés anti-prolifératives qu'ils soient liés ou non au fer. En effet, les analogues de PKIH ayant chélaté un atome de fer possèdent une grande activité redox car ils peuvent interagir avec le peroxyde d'hydrogène et participer à la réaction de Fenton produisant les ROS les plus actifs et dangereux. Les propriétés pro-apoptotiques des analogues de PKIH sont augmentées par la superoxyde dismutase (qui favorise la production de H₂O₂) alors qu'elles sont diminuées en présence de catalase (qui détoxifie H₂O₂) ce qui souligne le rôle de H₂O₂ dans ce phénomène⁴⁷⁷. Depuis quelques années, il a été montré que les ROS participent à un certain nombre de voies de signalisation

et n'ont donc pas que des effets dangereux pour les cellules. D'ailleurs, le peroxyde d'hydrogène est un ROS « non toxique » qui le devient en présence d'un excès de fer. Parmi les processus physiologiques dans lesquels les ROS pourraient être impliqués figure justement la différenciation. Peu de publications sont disponibles à l'heure actuelle, mais il semble que le fer et les ROS participent à des processus de différenciation hématopoïétiques.

Récemment, l'équipe de K.A. Ishii a montré le rôle des ROS dans l'activation des ostéoclastes et la résorption osseuse⁴⁷⁸. Ces processus peuvent être rapprochés de l'hématopoïèse dans la mesure où les ostéoclastes sont des cellules géantes multinucléées qui sont issues d'un progéniteur hématopoïétique appartenant au lignage monocytaire-macrophagique. En effet, les macrophages de la moelle osseuse se différencient en pré-ostéoclastes qui vont ensuite fusionner pour donner des ostéoclastes matures multinucléés sous l'influence de deux cytokines essentielles, le M-CSF et le RANKL (receptor Activator of Nuclear factor- κ B Ligand), cytokine de la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor). Les ostéoclastes sont responsables de la résorption osseuse, processus naturel participant à l'équilibre phospho-calcique, mais qui peut être augmenté de manière pathologique au cours de l'ostéoporose ou des métastases cancéreuses. Ces cellules multinucléées doivent sécréter de l'acide de manière intense et soutenue via une pompe à protons pour dégrader l'hydroxy-apatite dont sont formés les os. Ce processus entraîne une forte consommation énergétique et de ce fait, ces cellules contiennent de nombreuses mitochondries. Jusqu'à lors, on ne savait pas comment la biogénèse des mitochondries pouvait être corrélée à la différenciation et donc l'activation des ostéoclastes. Cette équipe a montré que les besoins en fer des ostéoclastes sont augmentés lors de ce processus. Par le système de régulation IRE/IRP, l'expression du TfR1 est augmentée à la surface des cellules. L'apport de fer qui en découle facilite la respiration mitochondriale et surtout, permet la synthèse de ROS. Ces ROS sont responsables de l'augmentation d'expression du facteur de transcription PGC-1 β qui lui-même augmente la biogénèse mitochondriale et participe à l'activation des ostéoclastes. L'apport de N-Acétylcystéine (NAC), antioxydant s'opposant à la formation des ROS, inhibe ce processus, de même que le DFO, soulignant le rôle essentiel des ROS et du fer dans la résorption osseuse. Ce mécanisme pourrait tout à fait expliquer pourquoi les patients thalassémiques, ayant donc une surcharge en fer, ont une résorption osseuse accélérée et encourage l'administration de chélateurs de fer chez ces patients.

Il semble que les ROS jouent également un rôle dans la signalisation des cytokines impliquées dans l'hématopoïèse. En effet, l'interleukine 3 (IL3) et l'érythropoïétine (EPO) stimulent leur récepteur couplé à la tyrosine kinase jak2 qui phosphoryle les résidus tyrosine de ce récepteur et induit l'activation des voies de signalisation STAT5, PI3K/AKT et Ras/MEK/ERK. En 2006, une équipe japonaise a rapporté que dans la lignée 32Dcl3, ces deux cytokines provoquent une augmentation rapide et transitoire (pic à 30 minutes) puis une augmentation plus tardive et progressive des ROS. La présence de NAC inhibe la

phosphorylation de STAT5, d'AKT, de MEK et d'ERK démontrant que les ROS sont nécessaires à l'activation de ces voies⁴⁷⁹. Le traitement des cellules par un excès d'H₂O₂ a l'effet opposé. Les mêmes observations ont été faites sur les lignées MO7e (lignée leucémique mégacaryoblastique) et TF1 (lignée leucémique érythroleucémique). Ces cellules passent de l'état quiescent à la mise en cycle lorsqu'elles sont stimulées par le GM-CSF, le SCF ou la TPO qui induisent un pic de ROS. H₂O₂ provoque de manière dose-dépendante la phosphorylation des tyrosines de plusieurs protéines impliquées dans la signalisation de ces facteurs de croissance alors que le PDTC (antioxydant) s'oppose à cet effet⁴⁸⁰. D'autre part, ces cytokines induisent la même production de ROS lorsque les cellules sont déplétées en ADN mitochondrial, suggérant que ces effets ne dépendent pas des mitochondries⁴⁷⁹. Nous avons réalisé les mêmes observations en traitant les lignées leucémiques HL60, OCI-AML3, NB4, THP1 et U937 par les chélateurs de fer, qui en induisant à court terme la production de ROS provoquent la différenciation cellulaire. Le traitement de ces lignées par le NAC ou le PDTC empêche l'induction de cette différenciation.

Il y a quelques mois à peine, et de manière tout à fait cohérente avec nos travaux, E. Owusu-Ansah et U. Barnejee ont montré le rôle important des ROS dans l'engagement et la différenciation myéloïde des progéniteurs hématopoïétiques de la drosophile⁴⁸¹. Il est connu que l'hématopoïèse de la drosophile et celle des vertébrés sont très proches et au cours des différents stades de différenciation larvaire de la drosophile, les cellules souches hématopoïétiques s'engagent vers le stade de progéniteurs qui vont se différencier en cellules fonctionnelles matures. Les plasmacytes, les cellules à cristaux et les lamellocytes constituent l'équivalent de notre lignage myéloïde. Les cellules souches expriment naturellement peu de ROS et les auteurs montrent que l'engagement des cellules souches vers les progéniteurs est corrélé à la survenue d'un pic de ROS qui s'éteint progressivement à mesure que les cellules se différencient. Quand la production de ROS est inhibée dans les progéniteurs, leur différenciation est retardée alors que l'augmentation des ROS par inhibition de la superoxyde dismutase favorise la différenciation. De même, l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale, qui augmente le niveau de ROS, provoque la différenciation prématurée de tous les progéniteurs quel que soit le stade larvaire où elle intervient. Etant donné que plusieurs publications ont montré que les ROS activent la voie de signalisation JNK, les auteurs ont regardé si cette voie n'était pas impliquée dans les phénomènes de différenciation qu'ils observent. Effectivement, chez la drosophile l'élévation du niveau de ROS provoque l'activation de JNK qui est responsable de la différenciation. L'interruption de la chaîne respiratoire mitochondriale associée à un dominant négatif de JNK produit une élévation des ROS sans induire de différenciation démontrant bien que l'activation de JNK a lieu en aval des ROS et qu'elle est indispensable à la différenciation. Enfin, dans plusieurs systèmes et organismes, les effecteurs de JNK sont le facteur de transcription FoxO, dont l'expression est augmentée, et les facteurs Polycomb, dont l'activité est diminuée. Par un système de gènes rapporteurs, les auteurs observent que l'augmentation des ROS induit via l'activation de JNK, l'augmentation d'expression de FoxO

et la down-régulation de Polycomb. Ceci aboutit à un phénotype de différenciation myéloïde complète où FoxO est responsable de l'augmentation des plasmacytes et des cellules à cristaux tandis que la répression des Polycomb favorise l'augmentation des lamellocytes. Il est important de souligner que le progéniteur hématopoïétique de la drosophile est beaucoup plus proche du progéniteur myéloïde commun que de la cellule souche chez l'Homme.

On ne sait pas actuellement si, chez l'Homme comme chez la drosophile, un pic de ROS est nécessaire à l'engagement des progéniteurs vers la différenciation myéloïde. En 2007, il a été rapporté que le niveau de ROS des progéniteurs myéloïdes est bien supérieur à celui observé dans les cellules souches⁴⁸². Dans cette publication S. Tothova utilise des souris dont l'expression des facteurs de transcription FoxO a été invalidée dans le système hématopoïétique et observe la diminution des cellules souches hématopoïétiques. Le défaut de FoxO dans les CSH provoque leur épuisement par « excès » de mise en cycle et induit leur apoptose et est responsable d'une augmentation aberrante du niveau de ROS favorisant l'instabilité génomique et l'acquisition d'événements oncogéniques. L'ajout de l'antioxydant NAC restaure la quiescence et la survie des CSH soulignant le rôle délétère des ROS dans le maintien de ces propriétés essentielles. Dans les progéniteurs, qu'ils soient sauvages ou invalidés pour les FoxO, le niveau de ROS est élevé, laissant supposer un rôle physiologique de cet état oxydatif à ce moment de la différenciation hématopoïétique. On peut souligner que, physiologiquement, les facteurs de transcription FoxOs sont phosphorylés directement par AKT ce qui entraîne leur exclusion nucléaire et leur dégradation. Dans les leucémies et les lymphomes, de nombreux oncogènes tels que FLT3-ITD, les transcrits de fusion BCR-ABL ou NPM-ALK augmentent la prolifération et la survie cellulaire *via* l'activation de la voie de signalisation PI3kinase/AKT et la diminution des FoxO⁴⁸³⁻⁴⁸⁵. Il a été montré récemment dans un modèle murin que la seule activation d'AKT favorise la mise en cycle et la diminution des CSH et aboutit au développement d'une leucémie⁴⁸⁶. La rapamycine, en inhibant mTOR, restaure les propriétés d'autorenouvellement des cellules souches et prolonge la survie des souris. Cette observation est un argument de plus pour nous inciter à explorer les relations entre l'axe PI3K/AKT/mTOR et la modulation de l'état oxydatif des cellules leucémiques par les chélateurs.

Une publication récente a également montré l'importance du rôle de BM1-1 dans le maintien des capacités d'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques en s'opposant à l'effet des ROS⁴⁸⁷. Nos travaux sur les lignées leucémiques montrent qu'aux doses où nous les utilisons, les chélateurs de fer induisent une production de ROS à court terme qui provoque leur différenciation. D'autre part, ces mêmes doses de chélateurs sont capables d'orienter les progéniteurs de sang de cordon vers la différenciation monocytaire en présence de cytokines. Il nous reste à déterminer si ce phénomène est lui-aussi dépendant des ROS et si la chélation en fer peut à elle-seule provoquer l'engagement des progéniteurs de sang de cordon dans la différenciation.

Plus proche encore de notre travail, le rôle des ROS a été récemment abordé dans la différenciation des lignées leucémiques HL60 et U937 induite par le TPA. Le TPA est un agent différenciant utilisé depuis de nombreuses années pour induire la différenciation macrophagique des lignées leucémiques. En 2009, l'équipe de Yamamoto a montré que le traitement de la lignée U937 par le TPA induit la production de ROS qui sont responsables de la différenciation de la lignée puisque leur inhibition par le NAC empêche la différenciation (mise en évidence dans cet article par l'augmentation d'expression du CD11b et par les propriétés de phagocytose)⁴⁸⁸. De plus, le TPA provoque des variations d'expression des enzymes antioxydantes. L'expression de la catalase, qui est responsable de la transformation de H_2O_2 en H_2O et O_2 est diminuée tandis que l'expression de la superoxyde dismutase dépendante du manganèse, qui catalyse la transformation des superoxydes (O_2^-) en H_2O_2 et O_2 , est augmentée. Le niveau de la superoxyde dismutase dépendante du cuivre et du zinc et de la glutathion dismutase, qui détoxifie H_2O_2 en utilisant le glutathion, ne varient pas. Le rôle essentiel de H_2O_2 dans ce processus de différenciation est souligné par le fait que le traitement des cellules U937 par la catalase inhibe la différenciation induite par le TPA. De la même manière, le TPA provoque la différenciation macrophagique de la lignée HL60 alors que la lignée HP100-1, variant de HL60 surexprimant la catalase, est résistante au TPA. Le traitement des cellules U937 par la superoxyde dismutase empêche l'augmentation du CD11b mais ne parvient pas à inhiber les propriétés de phagocytose. La catalase et la superoxyde dismutase sont deux enzymes qui détoxifient les ROS mais il semble que la différence de leurs effets sur la différenciation provienne du fait que H_2O_2 est un ROS diffusible, que la catalase peut détoxifier même en extracellulaire alors que O_2^- n'est pas atteint par l'apport extracellulaire de superoxyde dismutase (SOD). Le rôle de chacun de ces ROS dans la différenciation macrophagique reste en outre à préciser. Plusieurs études ont montré que les macrophages produisent des ROS grâce à la NADPH oxydase^{489,490}. D'autre part, le TPA est capable d'activer la NADPH oxydase via l'activation de la PKC⁴⁹¹. Dans cette publication, la différenciation macrophagique induite par le TPA semble donc due à l'augmentation de production des ROS par activation de la PKC et de la NADPH oxydase, à la diminution de la catalase qui dégrade H_2O_2 et à l'augmentation de SOD qui transforme les superoxydes en H_2O_2 . Cette observation est tout à fait cohérente avec ce que nous observons lorsque nous traitons les lignées leucémiques avec des chélateurs de fer. Il reste à déterminer dans de prochaines expériences si les chélateurs de fer activent la PKC.

Ces résultats semblent en contradiction avec un certain nombre d'études montrant que les antioxydants favorisent la différenciation cellulaire. En effet, l'équipe de Studzinski a montré à plusieurs reprises que des antioxydants agissent en synergie avec la vitamine D3 pour induire la différenciation^{465,492}. De même, une équipe a montré que le diéthylmaléate, un agent oxydant, s'oppose à la différenciation de la lignée HL60 induite par la PMA⁴⁹³. Pourtant, des agents différenciants comme l'acide butyrique et le béta-lapachone agissent en produisant des ROS^{494,495}. Il faut noter aussi que la vitamine D est anti-oxydante dans la lignée HL60 mais est pro-oxydante dans les cellules de cancer du sein⁴⁹⁶. Le rôle des ROS

dans la différenciation n'est donc pas encore clairement élucidé. Il apparaît que tous les agents différenciants ne sont pas des inducteurs de ROS. Ceux qui le sont n'induisent pas le même type de ROS et tous les ROS n'ont pas le même effet en fonction du type cellulaire. Il est aussi quasi certain que d'autres modifications de l'environnement cellulaire sont impliquées dans les phénomènes de différenciation. D'après ces différentes publications et nos observations, nous pensons qu'un pic de ROS est nécessaire pour engager la cellule souche vers la différenciation mais ces ROS étant toxiques, des mécanismes de régulation sont ensuite mis en place pour en diminuer leur concentration et permettre aux cellules de se différencier au lieu de rentrer en apoptose. D'ailleurs, nous montrons bien qu'à long terme, les chélateurs de fer inhibent la production de ROS et, si la vitamine D est bien anti-oxydante dans les cellules hématopoïétiques, cette combinaison d'agent anti-oxydant ne peut que favoriser la différenciation. Il nous reste à étudier plus en détails l'état oxydatif des cellules leucémiques et des progéniteurs hématopoïétiques sains traités par l'association des chélateurs de fer et de la vitamine D pour valider cette hypothèse.

1.4. Différenciation et microARN

Depuis quelques années, le rôle des microARN (miR) dans l'hématopoïèse est exploré de manière intensive. Ces ARN non codants d'une vingtaine de paires de bases agissent par homologie de séquence et inhibent la traduction des ARN messagers ou, comme les ARN interférents, peuvent induire leur dégradation. Le premier miR a été identifié en 1993 chez le nématode *C. Elegans* par une équipe qui tentait de décrypter les mécanismes moléculaires régissant le développement de cet organisme modèle. Les gènes codant pour ces ARN sont soit dispersés, soit regroupés dans des régions intergéniques ou, plus rarement, présents dans des introns de gènes codant pour des protéines. Chez *C. Elegans*, le taux de miR peut varier de 1000 à 50 000 molécules par cellule. Chez les mammifères, plus de 400 ARNm cibles ont été identifiés⁴⁹⁷. En hématopoïèse, ils sont notamment impliqués dans la différenciation. Par exemple, le miR-181 est retrouvé dans les cellules du lignage lymphoïde B et il semble être un régulateur positif de cette orientation puisque l'expression forcée du miR-181 dans des cellules souches hématopoïétiques murines augmente le nombre de cellules lymphoïdes B *in vitro* et *in vivo*⁴⁹⁸. Ce même miR181 voit son expression diminuée par la vitamine D dans les lignées HL60 et U937, dans lesquelles il régule l'expression de p27 et de p21 ce qui favorise l'arrêt du cycle cellulaire préalable à la différenciation⁴⁹⁹. Le miR-223 est un acteur important de la différenciation granuleuse où il est transcriptionnellement actif sous l'effet de C/EBP α ⁵⁰⁰. Ainsi, dans les LAM porteuses de la t(8;21) produisant la protéine de fusion AML1-ETO, on observe une inactivation épigénétique du gène codant miR-223 par la protéine chimère⁵⁰¹. L'expression du miR-223 est significativement augmentée par l'ATRA dans les lignées et les cellules primaires de leucémie aigüe

promyélocytaire⁵⁰². A l'inverse, peu de miR sont connus pour bloquer la différenciation myélo-monocytaire. P. Brousset a toutefois observé que dans des LAM et des MDS porteuses de la rare t(2;11), alors même que les gènes impliqués dans cette translocation ne sont pas connus, c'est la surexpression du miR-125-b-1 qui provoque un blocage de maturation⁵⁰³. Il existerait pour ce même miRNA un site de fixation dans la région 3' non traduite de l'ARN messager du VDR suggérant que le niveau de VDR est down-régulé en présence du miR-125b⁵⁰⁴. Dans une publication récente, D.G. Schaar a montré que le TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate), qui provoque la différenciation monocytaire de la lignée HL60, induit l'expression du miR-320 ciblant le RTf⁵⁰⁵. L'introduction de ce miR dans la lignée de carcinome pulmonaire A549 inhibe la prolifération cellulaire et est abolie par l'ajout de fer soluble dans le milieu de culture. Cette étude ne montre pas si la diminution d'expression du RTf par surexpression du miR-320 induirait la différenciation. Nous avons dessiné un miR ciblant le RTf mais les difficultés de transfection de la lignée HL60 nous empêchent pour l'instant de répondre à cette question. Aucune étude actuellement n'a montré l'induction ou la répression de miR par les chélateurs de fer dans les cellules hématopoïétiques. Il serait intéressant d'y trouver des miR impliqués dans la différenciation et, comme nous l'avons fait pour le transcriptome, nous pourrions comparer le profil de miRNA induits par la privation en fer à celui induit par la vitamine D.

1.5.Privation en fer et éradication des cellules souches leucémiques

Outre leurs propriétés différenciantes, les chélateurs de fer pourraient avoir la capacité d'éradiquer les cellules souches leucémiques. En effet, une équipe américaine a réalisé un screening à grande échelle de molécules non brevetées afin d'identifier de nouvelles drogues anticancéreuses du fait de leur capacité à inhiber l'expression de la survivine sans provoquer la mort de cellules HeLa⁵⁰⁶. Parmi les 4800 molécules testées, le ciclopirox était la seule à avoir rempli ces deux conditions. Le ciclopirox avait été développé pour ses propriétés antifongiques mais n'avait jamais été exploité. Cette équipe montre que le ciclopirox est capable *in vitro* d'induire l'apoptose de plusieurs lignées leucémiques et de blastes issus de patients atteints de LAM. Il agit également sur des progéniteurs indifférenciés issus de sang de cordon transduits avec les transcrits de fusion ML-ENL ou TLS-ERG dont les caractéristiques sont très proches des cellules souches. *In vivo*, le ciclopirox abolit la prise de greffe de cellules primaires de LAM dans les souris NOD/SCID indiquant son efficacité à éradiquer les cellules souches leucémiques. Aux concentrations où il exerce ses effets antileucémiques, le ciclopirox n'induit qu'une faible inhibition de clonogénicité sur les progéniteurs hématopoïétiques sains. Les auteurs démontrent que cette molécule agit en inhibant la ribonucléotide réductase grâce à ses propriétés de chélation du fer intracellulaire. La surexpression de la sous-unité R2 de la ribonucléotide réductase et

l'apport de fer intra-cellulaire inhibent les effets du ciclopirox. Enfin, cette molécule agit en synergie avec la cytarabine, chimiothérapie de référence dans le traitement des LAM. Les auteurs concluent en disant que le ciclopirox devrait être proposé pour le traitement des hémopathies malignes réfractaires. Cette molécule est semblable à un chélateur de fer intracellulaire tel que le DFX et cette étude va donc dans le même sens que nos résultats. Nous ne savons pas quel pourrait être l'effet des chélateurs de fer sur l'éradication des CSL. Pour répondre à cette question, il faudrait greffer des souris immunodéficientes avec des cellules primaires de patients atteints de LAM et évaluer l'effet du traitement par chélateur sur la capacité de transplantation de la maladie lors de greffes sériées. Des difficultés d'élevage des souris NOG nous ont empêchés de réaliser toute expérience de greffe de cellules primaires.

2. Intérêts de la chélation en fer dans les hémopathies malignes

D'un point de vue moins fondamental, les chélateurs de fer sont utilisés depuis de nombreuses années pour le traitement des surcharges en fer dans les hémochromatoses et les thalassémies et plus récemment dans les myélodysplasies. Un certain nombre d'observations cliniques sont en faveur d'un effet délétère de la surcharge en fer dans ces pathologies. Les études sont peu nombreuses dans les LAM mais les observations faites dans les MDS nous laissent penser que les indications des chélateurs de fer pourraient être étendues aux leucémies.

2.1. Origines de la surcharge en fer chez les patients myélodysplasiques

La principale cause de surcharge en fer chez les patients MDS est la transfusion de culots globulaires pour corriger l'anémie. L'inefficacité de l'érythropoïèse entraîne également une augmentation de l'absorption du fer intestinal. Il ne faut pas non plus oublier les mutations du gène HFE et les polymorphismes des autres régulateurs de l'homéostasie du fer que l'on retrouve chez les patients MDS au même titre que dans la population générale. Tout ceci pris en compte, il arrive que chez les patients MDS, la surcharge en fer ne soit pas corrélée aux besoins transfusionnels et survienne très tôt au cours de la maladie sans que l'on connaisse les raisons exactes de cette susceptibilité. En situation physiologique, la ferroportine régule le passage du fer depuis les entérocytes ou les macrophages vers la circulation sanguine. Quand le fer sérique est trop élevé, la sécrétion d'hepcidine est augmentée et entraîne la diminution d'expression de la ferroportine qui empêche l'export du fer. Une étude réalisée chez 16 patients MDS a montré que leur taux d'hepcidine urinaire était indétectable ou trop bas par rapport à leur surcharge en fer⁵⁰⁷. Il semble que la sécrétion de l'hepcidine soit régulée par GDF-15 et d'autres régulateurs d'origine érythroïde⁵⁰⁸. Il n'est donc pas étonnant que son niveau varie en fonction de l'inefficacité de l'érythropoïèse, variable d'un patient MDS à l'autre. D'autre part, cet excès de fer libre non régulé par la ferroportine, se retrouve dans le sérum où il dépasse les capacités de prise en charge par la transferrine. Il constitue alors un pool de fer labile plasmatique (LPI pour labile plasma iron) toxique, capable de pénétrer dans les cellules et d'exercer des effets néfastes par ses propriétés redox⁵⁰⁹. Une étude réalisée chez 176 patients atteints de MDS de bas grade (scores IPSS (pour International Prognostic Scoring System) bas et intermédiaire 1) a montré que 41% d'entre eux avaient un niveau de LPI élevé (List et al. Abstract n° 643a ASH 2008). Les chimiothérapies semblent en outre contribuer à alimenter ce pool de fer labile comme le montre deux études réalisées chez des patients recevant une allogreffe de moelle osseuse pour lesquels on détecte un pic de fer non liée à la transferrine 4 jours avant la

greffe et son élévation durant les deux semaines qui suivent le traitement de conditionnement^{510,511}. Les chimiothérapies d'induction et de consolidation durant le traitement des LAM produisent la même élévation de pool de fer labile⁵¹². Il semblerait que la diminution d'utilisation du fer par la moelle et son relargage par les autres organes soient à l'origine de cette augmentation dont les conséquences directes sont des dommages cellulaires, une augmentation du risque infectieux et un risque plus élevé de décès post-greffe.

2.2.Prise en charge thérapeutique de la surcharge en fer

Avant la mise sur le marché de chélateurs administrables par voie orale, le DFX et le deferiprone, le seul chélateur de fer disponible était le DFO. Du fait de l'obligation de son administration parentérale et de sa demi-vie très courte, ce chélateur n'était essentiellement utilisé que dans les pathologies où la surcharge en fer était évidente, c'est-à-dire les thalassémies et les anémies réfractaires congénitales. Dans ces pathologies, la surcharge en fer est due au défaut de productivité de la moelle osseuse requérant une augmentation d'absorption du fer intestinal et surtout aux transfusions de globules rouges répétées pour corriger l'anémie. Les effets délétères de la surcharge en fer se voient essentiellement au niveau du coeur, l'insuffisance cardiaque étant la principale cause de décès dans les béta-thalassémies sévères⁵¹³. Dans une étude publiée dans le New England Journal of Medicine en 1994, l'administration de DFO et une ferritinémie inférieure à 2500 ng/mL était clairement associée à une meilleure survie (100% à 10 ans et 91% à 15 ans) malgré la poursuite des transfusions sanguines⁵¹⁴. Les analyses rétrospectives faites dans ces pathologies sont aisées car il existe un recul de quasiment 20 ans pour l'administration des chélateurs de fer qui font partie du traitement standard. De plus, ces études ne semblent pas affectées par un biais de recrutement car elles peuvent facilement comparer les patients ayant reçu des chélateurs de fer avec ceux qui n'ont pas pu les recevoir du fait principalement d'une intolérance. Dans les MDS et a fortiori dans les LAM, il en est tout autre. D'une part, la question des chélateurs se pose depuis beaucoup moins longtemps, ce qui pénalise la réalisation d'études rétrospectives. D'autre part, les études sont soumises à de nombreux biais du fait d'une grande hétérogénéité de la pathologie et d'une non-standardisation d'administration des chélateurs (proposés aux patients ayant eu plus de transfusions ou ayant des marqueurs de gravité ou traités dans un centre habitué à cette prescription en fonction de la ferritinémie...)⁵¹⁵.

La surcharge en fer dans les MDS est un problème reconnu par tous les médecins qui prennent en charge ces patients mais il n'existe pas vraiment de consensus pour la prévenir et/ou la traiter. Un certain nombre de groupes de cliniciens ont publié récemment leurs recommandations et il persiste une hétérogénéité de prescription des chélateurs de fer.

Pour initier le traitement par chélateurs, ces groupes se basent sur les antécédents transfusionnels mais ne sont pas d'accord sur le nombre de transfusion au-delà duquel le patient doit être traité (>20 concentrés globulaires, >25, > 50, plus de deux concentrés globulaires pendant au moins un an ou aucun seuil requis). De même lorsqu'ils prennent en compte la ferritinémie pour débiter la chélation : le taux de ferritine sérique minimal varie de 1000 à 2500 ng/mL selon le groupe de recommandations⁵¹⁶⁻⁵¹⁹.

Il faut d'ailleurs noter que la plupart des études se basent sur la ferritinémie pour évaluer la surcharge en fer, ce qui ne semble pas être le meilleur marqueur. En effet, la ferritinémie ne reflète pas vraiment l'état des stocks de fer car la ferritine est une protéine de la phase aigüe de l'inflammation. Son augmentation n'est donc pas spécifique. Il semblerait aussi qu'il existe des variations inter-laboratoires pour la mesure de ce paramètre. Le foie et le cœur sont les deux organes pour lesquels leur concentration en fer est directement liée à la sévérité de la pathologie de surcharge. Le « gold standard » pour évaluer la surcharge en fer du foie est la biopsie hépatique. En pratique, ce geste n'est quasiment jamais réalisé chez les patients MDS en raison du risque de saignement et d'infection du fait de leur thrombopénie et de leur neutropénie. L'imagerie par résonance magnétique T2 semble être une bonne technique non-invasive pour évaluer la surcharge en fer cardiaque et hépatique. Quelques études dans les MDS ont utilisé cette technique^{520,521}. Comme observé dans les anémies congénitales, il existe une discordance entre la surcharge en fer dans le foie et dans le cœur. De plus, la surcharge cardiaque en fer semble moins fréquente et moins importante qu'elle n'avait été envisagée. Il demeure toutefois que les patients qui ont reçu plus de 100 concentrés globulaires ont un risque plus important de développer une pathologie cardiaque de surcharge. Dans une étude réalisée chez 12 patients MDS requérant des transfusions régulières, l'imagerie par résonance magnétique a montré la baisse significative de la concentration du fer hépatique après traitement par DFX (List et al. Abstract n°1470, ASH 2007). Les résultats d'une étude prospective à plus grande échelle ont été publiés en 2008 et ont confirmé l'efficacité du DFX pour réduire la surcharge en fer. Malheureusement, il manque toujours une étude prospective établissant un lien entre la surcharge cardiaque en fer et la survie et montrant le bénéfice des chélateurs pour la fonction cardiaque dans ces pathologies. En effet, des dépôts de fer intracardiaque ont bien été observés chez des patients décédés de leucémie aigüe ou d'une autre pathologie avec anémie et ayant recours aux transfusions. De manière indirecte, cette surcharge en fer a été étiquetée comme facteur de risque cardiaque influençant la morbidité et la mortalité dans les MDS. Seulement, il est impossible de savoir si ce n'est pas l'anémie elle-même qui a augmenté le risque cardiaque et si le besoin transfusionnel n'est pas finalement juste le reflet de la sévérité de la MDS⁵¹⁵.

Avec toutes les limites que nous leur connaissons, un certain nombre d'études cliniques rétrospectives réalisées chez les patients MDS montrent toutefois que le traitement par chélateurs de fer prolonge la survie. Une étude réalisée par C. Chee n'a pas trouvé de

corrélation entre la ferritinémie, le besoin transfusionnel et la survie, mais le suivi des patients était incomplet et les causes de décès pas toujours élucidées⁵²². Malgré cela, il persiste des médecins réfractaires qui ne voient pas l'intérêt d'administrer ces traitements coûteux et pourvoyeurs d'effets secondaires non négligeables (agranulocytose, insuffisance rénale et hépatique pour le DFX) chez des patients dont la médiane de survie est de seulement deux ans, soit une durée beaucoup trop courte pour que les effets délétères de la surcharge en fer sur le cœur doivent être pris en compte. D'une part, cet argument n'est valable que chez les patients MDS de haut grade, dont la survie est effectivement très courte. D'autre part, plusieurs publications montrent que dans les MDS le bénéfice des chélateurs ne vient pas seulement de la réduction du risque cardiaque et d'insuffisance hépatique mais aussi de leurs effets directs sur l'évolution de la pathologie elle-même.

2.3.Surcharge en fer et risque infectieux

De nombreuses études ont fait le lien entre la surcharge en fer et le risque infectieux : dès 1969, l'équipe de L. Caroline faisait le lien entre l'excès de fer libre plasmatique et la capacité des sérums de patients leucémiques à faire proliférer *Candida Albicans*⁵²³. Quelques années plus tard, JL Karp rapportait l'association entre l'incapacité de lier le fer sérique et la survenue d'infections fongiques chez des patients leucémiques non neutropéniques⁵²⁴. Plus récemment, une équipe a montré que l'apport d'apotransferrine dans le sérum de patient ayant subi une allogreffe de moelle prévient la prolifération de *Staphylococcus Epidermidis*⁵²⁵. Il apparaît donc clairement que chez les patients MDS, la neutropénie combinée à un défaut des fonctions des polynucléaires neutrophiles et à un excès de fer libre favorisent très nettement la survenue d'infections bactériennes et fongiques. Dans un essai de phase 2 réalisé chez des patients MDS de bas grade et intermédiaires 1, l'administration quotidienne de DFX (20mg/kg) a permis de réduire leur LPI (List et al. Abstract n°634a ASH 2008). Une autre étude similaire réalisée chez 300 patients MDS a également démontré la capacité du DFX à réduire le LPI (Porter et al. Abstract n° 2675a ASH 2008). Le DFX est aussi capable d'améliorer les paramètres du stress oxydatif chez ces patients. In vitro, les érythrocytes et les plaquettes des patients MDS ont un niveau élevé de ROS et un taux bas de glutathion (résultant de l'excès de fer libre). Ces paramètres sont nettement améliorés après incubation des cellules avec le DFO ou le deferiprone⁵²⁶. Le problème du DFO est qu'une fois qu'il a chélaté le fer, il peut agir comme un sidérophore et favoriser la prolifération des champignons tels que les *Mucor*⁵²⁷. Le DFX et le deferiprone semblent au contraire avoir une activité antifongique *in vitro* et *in vivo* dans des modèles animaux⁵²⁸. Il est donc tout à fait possible que l'administration quotidienne de DFX chez les patients MDS réduise leur susceptibilité aux infections avant même de réduire leur surcharge en fer mais ceci reste à évaluer dans un essai clinique. Nous avons montré que

l'association de la privation en fer à la vitamine D augmente significativement l'expression transcriptionnelle de la cathelicidine, peptide antimicrobien endogène sécrété par les polynucléaires neutrophiles et les macrophages⁵²⁹. Gombart a rapporté que la vitamine D induisait l'expression de ce peptide dans de nombreuses lignées tumorales (prostate, lymphome, tumeurs de l'endomètre) et pouvait même agir en synergie avec le butyrate de sodium, un inhibiteur d'histones déacétylases³³⁴. Dans notre expérience, l'administration d'EXJADE® et de vitamine D chez un patient neutropénique atteint de LAM post-MDS a possiblement aidé à contrôler plusieurs épisodes infectieux majeurs (orchite, cystite).

2.4.Surcharge en fer et allogreffe de moelle

L'allogreffe de moelle osseuse est le seul traitement curatif des MDS. La surcharge en fer, estimée par mesure de la ferritinémie, est courante dans le bilan pré-greffe de ces patients et associée à une survie globale plus courte dans plusieurs études^{530,531}. Cet effet néfaste serait plus marqué chez les patients greffés à la suite d'une MDS ou d'une LAM que chez les patients greffés pour une autre indication et ne serait pas lié au type de conditionnement^{532,533}. Une de ces études a montré que la survie globale des patients ayant une ferritinémie supérieure à 1000 ng/mL était moins bonne et qu'elle ne dépendait pas des antécédents transfusionnels, suggérant que la transfusion de concentrés globulaires n'était pas la seule raison de la surcharge en fer⁵³¹. De plus, cette surcharge est associée à la survenue d'infections et de maladie veino-occlusive^{530,534}. De manière intéressante, la plupart de ces complications surviennent dans les 3 premiers mois après la greffe, c'est-à-dire exactement dans la même période où l'on a constaté l'augmentation du pool de fer libre. Il serait donc intéressant d'étudier si la diminution du pool de fer libre pendant cette période critique ne pourrait pas avoir un effet bénéfique sur le devenir des patients. L'administration de DFO juste après la greffe pose cependant le problème de favoriser la survenue d'infections et le DFX peut provoquer des effets gastro-intestinaux et rénaux critiques durant cette période. La solution idéale pour réduire les décès liés à la greffe serait peut-être alors d'utiliser les chélateurs de fer en prévention de la surcharge et en prévision de la greffe. D'ailleurs, dans une publication très récente, l'équipe de J. Storey s'est attachée à trouver la meilleure façon d'évaluer la surcharge en fer chez les patients destinés à être greffés. Ils ont ainsi construit un score (appelé Transplant Iron Score) basé sur la dépendance transfusionnelle (estimée en nombre de culots globulaires reçus, valant un point si ce nombre dépasse 25), la ferritine sérique (valant un point si supérieure à 1000ng/mL) et la charge médullaire en fer (estimée par microscopie après coloration de frottis de moelle par la méthode de Gomori et valant un point si cotée à 6). Chacun de ces paramètres est corrélé individuellement à un risque de décès plus important au décours de la greffe mais cette association est hautement significative lorsque ces 3 paramètres sont rassemblés dans un

seul score (allant de 0 à 3). Ainsi, chaque augmentation d'un point du score est associée à un risque de décès deux fois plus élevé et un score ≥ 2 est associé à une diminution de 50% de survie à 1 an. Cette étude confirme l'impact négatif de la surcharge en fer sur le devenir des patients allogreffés en terme de décès liés au traitement et de risque d'infections sévères⁵³⁵.

2.5. Surcharge en fer et instabilité génomique

Les MDS peuvent se transformer en LAM essentiellement du fait de l'instabilité génomique des progéniteurs hématopoïétiques qui accumulent plusieurs anomalies génétiques et finissent par être bloqués dans la différenciation et prolifèrent de manière incontrôlée. L'excès de fer libre produit des ROS qui sont responsables de cette instabilité génomique et le fer est un élément essentiel pour les enzymes impliquées dans l'oncogénèse^{383,536}. Dans une grande étude multicentrique, il a été montré que la surcharge en fer est non seulement liée à une diminution de la survie globale mais aussi à une diminution du délai de survenue de leucémie (Sanz et al. Abstract n° 640a ASH 2008). Il semble logique alors que les chélateurs de fer, en diminuant le pool de fer libre et en s'opposant de fait à la production de ROS, puissent retarder la transformation des MDS en leucémie. Dans une étude réalisée chez 18 patients MDS de bas grade et de risque intermédiaire 1, la médiane de survie sans leucémie n'était pas atteinte à 226 mois chez les patients recevant du DFO alors qu'elle était de 40 mois pour le groupe contrôle (Leitch et al. Abstract n°1469a ASH 2007). Une étude française incluant 165 patients traités dans 18 centres différents a rapporté une augmentation de la survie globale chez les patients recevant un chélateur de fer. Malheureusement, cette étude n'a pas étudié le délai de survenue de leucémie (Rose et al. Abstract n° 249a ASH 2007).

Il semblerait que les chélateurs ont un effet favorable sur l'hématopoïèse des patients MDS : une amélioration des paramètres hématologiques a été observée chez 5% des patients atteints de MDS de bas grade et de risque intermédiaire 1 recevant du DFX. Ces effets pourraient dépendre de la capacité du DFX à diminuer le pool de fer libre et la production de ROS ayant pour conséquence de diminuer l'apoptose cellulaire. Le DFX pourrait aussi moduler l'apoptose en agissant sur la voie de signalisation NF- κ B (Messa et al. Abstract n° 2671a ASH 2008). *In vitro* en milieu semi-solide, les progéniteurs hématopoïétiques provenant de patient MDS ayant une ferritinémie élevée forment moins de colonies érythroïdes que ceux provenant de patients n'ayant pas de surcharge en fer. Le nombre de colonies granuleuses semblent identique (Hartmann et al. Abstract n° 2694a ASH 2008). Cette étude a recruté des patients MDS de tous les grades, et il est donc difficile de savoir si cette différence de pousse n'est pas liée à des stades différents de MDS. En outre, les auteurs n'ont pas testé l'effet des chélateurs de fer sur la pousse des colonies. Lors de notre travail, nous avons montré que l'ajout de chélateur au milieu semi-solide inhibe la croissance

des colonies érythroïdes tandis que pour les colonies granuleuses, l'engagement vers le lignage monocytaire est favorisé. La prolifération des progéniteurs issus de sang de cordon n'est pas modifiée puisque le nombre de colonies est le même qu'il y ait eu un traitement par chélateur ou pas. Il serait intéressant de faire la même expérience avec des progéniteurs issus de moelle de patients MDS ayant une surcharge en fer afin de voir si les chélateurs peuvent améliorer la capacité de prolifération de ces cellules et/ou modifier leur engagement dans la différenciation. Il se trouve que chez deux patients LAM/MDS à qui nous avons administré de l'EXJADE® et de la vitamine D, nous avons observé une amélioration des cytopénies et une diminution des besoins transfusionnels, ce qui est tout à fait en faveur d'un effet bénéfique de la chélation en fer sur une hématoïèse défailante.

2.6.Vers un protocole clinique ?

Les résultats que nous avons obtenus *in vitro* et *in vivo*, ainsi que les observations faites sur les deux patients LAM/MDS en échec de tout traitement et ayant reçu la combinaison EXJADE® et vitamine D nous ont conduit à proposer la réalisation d'un essai clinique utilisant ce traitement. Nous avons contacté deux groupes de cliniciens spécialistes des leucémies aigües myéloblastiques (groupe ALFA pour Acute Leukemia French Association) et des myélodysplasies (GFM pour Groupe Français des Myélodysplasies) qui ont pour objectifs de contribuer aux travaux de recherche biologique permettant de faire progresser le traitement de ces pathologies et de promouvoir des essais cliniques. Plusieurs questions se posent avant la mise en place d'un essai clinique. Tout d'abord, à quels patients doit être administré ce nouveau traitement ? Des avancées thérapeutiques ont été faites ces dernières années dans le traitement des LAM mais elles ont essentiellement permis une augmentation de la survie des patients les plus jeunes alors que la LAM est paradoxalement une pathologie du sujet âgé. Il se trouve que les protocoles cliniques de chimiothérapie intensive qui ont inclus des patients âgés (de plus de 56, 60 ou 65 ans selon les protocoles) ont obtenu une survie médiane de 10 mois avec un risque de décès lié au traitement d'induction de 15 à 20%. Il apparaît de ce fait difficile d'administrer une chimiothérapie intensive à ces patients. Un consortium des centres américains de lutte contre le cancer a d'ailleurs recommandé que les nouveaux essais cliniques soient proposés en priorité aux patients âgés. De ce fait, Il semble raisonnable de proposer notre traitement à des patients atteints de LAM ou de MDS en rechute et/ou réfractaire à toute chimiothérapie ainsi qu'aux patients âgés non éligibles pour un traitement par chimiothérapie intensive. Ensuite, se pose la question de l'association de notre traitement à une chimiothérapie non-intensive. Tous les essais cliniques les plus récents ont testé de nouvelles drogues en association à la cytarabine à faible dose, qui reste la chimiothérapie de référence chez les sujets âgés. Pour le traitement des LAM *de novo*, la combinaison EXJADE® et vitamine D pourrait donc tout à fait être

associée à cette molécule. Pour le traitement des LAM secondaires à une myélodysplasie, la 5'-azacytidine figure aujourd'hui en bonne place. En effet, dans une étude prospective française multicentrique et randomisée récente, P. Fenaux a comparé la survie globale de 358 patients atteints de MDS de haut risque traités soit par traitement conventionnel, soit par azacytidine (75mg/m²/jour pendant 7 jours tous les 28 jours)⁵³⁷. Le traitement conventionnel comprenait soit l'administration de facteurs de croissance, de concentrés globulaires et d'antibiotiques seuls, soit leur association à la cytarabine à faible dose (20mg/m²/jour pendant 14 jours tous les 28 jours), soit leur association à un schéma de chimiothérapie intensive avec induction et consolidation. Le traitement par azacytidine a permis une augmentation significative de la médiane de survie globale (24,4 mois vs 15 mois, p=0,0001) et a nettement ralenti la progression de la maladie. Comme l'azacytidine, la decitabine inhibe les méthyltransférases et permet la réexpression de certains gènes, parmi lesquels figurent les facteurs de transcription essentiels à l'hématopoïèse, dont le promoteur était méthylé. Malheureusement, le seul essai clinique randomisé comparant la decitabine aux traitements dits « de support » (facteurs de croissance, transfusions et antibiotiques) n'a pas montré une différence de survie significative⁵³⁸. Nous nous sommes donc orientés logiquement vers l'association de l'EXJADE® et de la vitamine D à l'azacytidine. Nous sommes actuellement en train d'effectuer le recueil de données préliminaires pendant la rédaction du protocole. Par ailleurs, nous avons breveté l'association de la privation en fer à la vitamine D dans le traitement des cancers (INSERM transfert, brevet référence BIO 08 419). Les perspectives de cet aspect du travail sont d'évaluer les effets *in vivo* de l'association EXJADE® et vitamine D chez les patients leucémiques en termes de tolérance, de différenciation, de progression ou de régression de la maladie et de qualité de vie. Nous souhaitons également poursuivre les investigations réalisées *in vitro* pour étudier les possibilités d'association de ce traitement avec d'autres drogues telles que la rapamycine, les inhibiteurs d'histone déacétylases ou le TLK199, un nouvel activateur de JunKinase actuellement testé en phase I-II chez les patients MDS aux Etats-Unis⁵³⁹.

L'ensemble de ce travail a donc permis de nombreuses avancées dans la compréhension du rôle du récepteur de la transferrine et du fer en onco-hématologie. D'un point de vue fondamental, nous avons montré que l'homéostasie du fer est un élément clé de l'hématopoïèse normale et pathologique. Le fer pourrait donc figurer au même titre que la vitamine D dans les schémas de régulation de l'hématopoïèse. En effet, le fer est directement impliqué dans le maintien de l'équilibre redox des cellules et son excès comme son déficit sont délétères. Au niveau d'une cellule différenciée, la rupture de l'équilibre provoque la mort cellulaire. Dans un progéniteur hématopoïétique ou une cellule souche, cette perte d'équilibre est nécessaire à l'engagement dans la différenciation et active plusieurs voies de signalisation mais doit être rapidement contrôlée pour éviter la mort cellulaire par toxicité. D'un point de vue plus appliqué, l'homéostasie du fer et les conséquences de son ciblage par les chélateurs sont particulièrement intéressantes dans les LAM et les MDS car ils représentent une nouvelle opportunité thérapeutique différenciante

attractive et prometteuse dans ces pathologies où la survie à long terme des patients reste médiocre. L'association des chélateurs à la vitamine D permet de potentialiser les effets différenciants de ces deux drogues sans provoquer les effets secondaires qui ont toujours freiné l'utilisation de la vitamine D en thérapeutique malgré ses propriétés différenciantes évidentes connues de longue date.

BIBLIOGRAPHIE

1. Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006;368:1894-1907.
2. Kane EV, Roman E, Cartwright R, Parker J, Morgan G. Tobacco and the risk of acute leukaemia in adults. *Br J Cancer*. 1999;81:1228-1233.
3. Moorman AV, Roman E, Cartwright RA, Morgan GJ. Smoking and the risk of acute myeloid leukaemia in cytogenetic subgroups. *Br J Cancer*. 2002;86:60-62.
4. Nakanishi M, Tanaka K, Shintani T, Takahashi T, Kamada N. Chromosomal instability in acute myelocytic leukemia and myelodysplastic syndrome patients among atomic bomb survivors. *J Radiat Res (Tokyo)*. 1999;40:159-167.
5. Gundestrup M, Storm HH. Radiation-induced acute myeloid leukaemia and other cancers in commercial jet cockpit crew: a population-based cohort study. *Lancet*. 1999;354:2029-2031.
6. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999;341:1051-1062.
7. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33:451-458.
8. Mrozek K, Bloomfield CD. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:169-177.
9. Grimwade D, Walker H, Harrison G, et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*. 2001;98:1312-1320.
10. Farag SS, Archer KJ, Mrozek K, et al. Pretreatment cytogenetics add to other prognostic factors predicting complete remission and long-term outcome in patients 60 years of age or older with acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *Blood*. 2006;108:63-73.
11. Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*. 2007;109:431-448.
12. Warner JK, Wang JC, Hope KJ, Jin L, Dick JE. Concepts of human leukemic development. *Oncogene*. 2004;23:7164-7177.
13. Jordan CT, Guzman ML. Mechanisms controlling pathogenesis and survival of leukemic stem cells. *Oncogene*. 2004;23:7178-7187.
14. Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:80-97.
15. He LZ, Tribioli C, Rivi R, et al. Acute leukemia with promyelocytic features in PML/RARalpha transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:5302-5307.
16. Grisolan JL, Wesselschmidt RL, Pelicci PG, Ley TJ. Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences. *Blood*. 1997;89:376-387.
17. 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.
18. Downing JR. The core-binding factor leukemias: lessons learned from murine models. *Curr Opin Genet Dev*. 2003;13:48-54.

19. Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG. FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood*. 2002;99:310-318.
20. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:639-649.
21. Dash A, Gilliland DG. Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001;14:49-64.
22. Whitman SP, Ruppert AS, Radmacher MD, et al. FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. *Blood*. 2008;111:1552-1559.
23. Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, Kiyoi H, Naoe T. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia*. 2005;19:1345-1349.
24. Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters--an analysis of 3082 patients. *Blood*. 2008;111:2527-2537.
25. Renneville A, Roumier C, Biggio V, et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*. 2008;22:915-931.
26. Frohling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol*. 2005;23:6285-6295.
27. Schittenhelm MM, Shiraga S, Schroeder A, et al. Dasatinib (BMS-354825), a dual SRC/ABL kinase inhibitor, inhibits the kinase activity of wild-type, juxtamembrane, and activation loop mutant KIT isoforms associated with human malignancies. *Cancer Res*. 2006;66:473-481.
28. Gabillot-Carre M, Lepelletier Y, Humbert M, et al. Rapamycin inhibits growth and survival of D816V-mutated c-kit mast cells. *Blood*. 2006;108:1065-1072.
29. Braun T, Fenaux P. Farnesyltransferase inhibitors and their potential role in therapy for myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2008;141:576-586.
30. Ravoet C, Mineur P, Robin V, et al. Farnesyl transferase inhibitor (lonafarnib) in patients with myelodysplastic syndrome or secondary acute myeloid leukaemia: a phase II study. *Ann Hematol*. 2008;87:881-885.
31. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2002;100:4325-4336.
32. Adya N, Stacy T, Speck NA, Liu PP. The leukemic protein core binding factor beta (CBFbeta)-smooth-muscle myosin heavy chain sequesters CBFalpha2 into cytoskeletal filaments and aggregates. *Mol Cell Biol*. 1998;18:7432-7443.
33. Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. 1998;92:2322-2333.
34. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*. 2000;96:4075-4083.
35. Byrd JC, Dodge RK, Carroll A, et al. Patients with t(8;21)(q22;q22) and acute myeloid leukemia have superior failure-free and overall survival when repetitive cycles of high-dose cytarabine are administered. *J Clin Oncol*. 1999;17:3767-3775.
36. Byrd JC, Ruppert AS, Mrozek K, et al. Repetitive cycles of high-dose cytarabine benefit patients with acute myeloid leukemia and inv(16)(p13q22) or t(16;16)(p13;q22): results from CALGB 8461. *J Clin Oncol*. 2004;22:1087-1094.

37. Schlenk RF, Benner A, Krauter J, et al. Individual patient data-based meta-analysis of patients aged 16 to 60 years with core binding factor acute myeloid leukemia: a survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J Clin Oncol.* 2004;22:3741-3750.
38. Rubnitz JE, Behm FG, Downing JR. 11q23 rearrangements in acute leukemia. *Leukemia.* 1996;10:74-82.
39. Cui X, De Vivo I, Slany R, Miyamoto A, Firestein R, Cleary ML. Association of SET domain and myotubularin-related proteins modulates growth control. *Nat Genet.* 1998;18:331-337.
40. Schoch C, Schnittger S, Klaus M, Kern W, Hiddemann W, Haferlach T. AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood.* 2003;102:2395-2402.
41. Pui CH, Raimondi SC, Srivastava DK, et al. Prognostic factors in infants with acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2000;14:684-687.
42. Dohner K, Tobis K, Ulrich R, et al. Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *J Clin Oncol.* 2002;20:3254-3261.
43. Steudel C, Wermke M, Schaich M, et al. Comparative analysis of MLL partial tandem duplication and FLT3 internal tandem duplication mutations in 956 adult patients with acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003;37:237-251.
44. Nerlov C. C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:394-400.
45. Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, et al. AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med.* 2001;7:444-451.
46. Leroy H, Roumier C, Huyghe P, Biggio V, Fenaux P, Preudhomme C. CEBPA point mutations in hematological malignancies. *Leukemia.* 2005;19:329-334.
47. Keilholz U, Menssen HD, Gaiger A, et al. Wilms' tumour gene 1 (WT1) in human neoplasia. *Leukemia.* 2005;19:1318-1323.
48. Ellisen LW, Carlesso N, Cheng T, Scadden DT, Haber DA. The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *EMBO J.* 2001;20:1897-1909.
49. Summers K, Stevens J, Kakkas I, et al. Wilms' tumour 1 mutations are associated with FLT3-ITD and failure of standard induction chemotherapy in patients with normal karyotype AML. *Leukemia.* 2007;21:550-551; author reply 552.
50. Fenaux P, Jonveaux P, Quiquandon I, et al. P53 gene mutations in acute myeloid leukemia with 17p monosomy. *Blood.* 1991;78:1652-1657.
51. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol.* 2001;19:1405-1413.
52. Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, et al. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood.* 1994;84:3148-3157.
53. Mueller BU, Pabst T, Osato M, et al. Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2002;100:998-1007.
54. Dohner K, Tobis K, Bischof T, et al. Mutation analysis of the transcription factor PU.1 in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia: a study of the AML Study Group Ulm (AML5G ULM). *Blood.* 2003;102:3850; author reply 3850-3851.
55. Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, et al. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood.* 2003;102:1613-1618.

56. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WL, et al. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients. *Blood*. 2003;101:837-845.
57. Metzeler KH, Dufour A, Benthaus T, et al. ERG expression is an independent prognostic factor and allows refined risk stratification in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a comprehensive analysis of ERG, MN1, and BAALC transcript levels using oligonucleotide microarrays. *J Clin Oncol*. 2009;27:5031-5038.
58. Langer C, Marcucci G, Holland KB, et al. Prognostic importance of MN1 transcript levels, and biologic insights from MN1-associated gene and microRNA expression signatures in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol*. 2009;27:3198-3204.
59. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009;360:2289-2301.
60. Tefferi A, Levine RL, Lim KH, et al. Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFR α correlates. *Leukemia*. 2009;23:900-904.
61. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*. 2009;114:144-147.
62. Ley TJ, Mardis ER, Ding L, et al. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 2008;456:66-72.
63. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*. 2009;361:1058-1066.
64. Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005;106:1154-1163.
65. Lowenberg B, Griffin JD, Tallman MS. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2003:82-101.
66. Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA. Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:98-117.
67. Berman E, Heller G, Santorsa J, et al. Results of a randomized trial comparing idarubicin and cytosine arabinoside with daunorubicin and cytosine arabinoside in adult patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia. *Blood*. 1991;77:1666-1674.
68. Vogler WR, Velez-Garcia E, Weiner RS, et al. A phase III trial comparing idarubicin and daunorubicin in combination with cytarabine in acute myelogenous leukemia: a Southeastern Cancer Study Group Study. *J Clin Oncol*. 1992;10:1103-1111.
69. Weick JK, Kopecky KJ, Appelbaum FR, et al. A randomized investigation of high-dose versus standard-dose cytosine arabinoside with daunorubicin in patients with previously untreated acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood*. 1996;88:2841-2851.
70. Buchner T, Hiddemann W, Wormann B, et al. Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group. *Blood*. 1999;93:4116-4124.
71. Arlin Z, Case DC, Jr., Moore J, et al. Randomized multicenter trial of cytosine arabinoside with mitoxantrone or daunorubicin in previously untreated adult patients with acute nonlymphocytic leukemia (ANLL). Lederle Cooperative Group. *Leukemia*. 1990;4:177-183.
72. Mandelli F, Vignetti M, Suci S, et al. Daunorubicin versus mitoxantrone versus idarubicin as induction and consolidation chemotherapy for adults with acute myeloid leukemia: the EORTC and GIMEMA Groups Study AML-10. *J Clin Oncol*. 2009;27:5397-5403.
73. Bishop JF, Lowenthal RM, Joshua D, et al. Etoposide in acute nonlymphocytic leukemia. Australian Leukemia Study Group. *Blood*. 1990;75:27-32.
74. Hann IM, Stevens RF, Goldstone AH, et al. Randomized comparison of DAT versus ADE as induction chemotherapy in children and younger adults with acute myeloid leukemia. Results of the

Medical Research Council's 10th AML trial (MRC AML10). Adult and Childhood Leukaemia Working Parties of the Medical Research Council. *Blood*. 1997;89:2311-2318.

75. Estey EH, Thall PF, Cortes JE, et al. Comparison of idarubicin + ara-C-, fludarabine + ara-C-, and topotecan + ara-C-based regimens in treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia, refractory anemia with excess blasts in transformation, or refractory anemia with excess blasts. *Blood*. 2001;98:3575-3583.

76. Litzow MR, Othus M, Cripe LD, et al. Failure of three novel regimens to improve outcome for patients with relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: a report from the Eastern Cooperative Oncology Group. *Br J Haematol*. 2009.

77. Candoni A, Simeone E, Tiribelli M, Malagola M, Russo D, Fanin R. FLAIE (fludarabine, cytarabine, idarubicin, and etoposide), a four drug induction chemotherapy for adult acute myeloid leukemia: A single center experience. *Am J Hematol*. 2009;84:690-692.

78. Lowenberg B, van Putten W, Theobald M, et al. Effect of priming with granulocyte colony-stimulating factor on the outcome of chemotherapy for acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003;349:743-752.

79. Wang J, An L, Chen S, et al. Prophylactic use of granulocyte colony-stimulating factor after chemotherapy does not affect survival rate in acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Acta Haematol*. 2009;121:223-226.

80. Bradstock KF, Matthews JP, Lowenthal RM, et al. A randomized trial of high-versus conventional-dose cytarabine in consolidation chemotherapy for adult de novo acute myeloid leukemia in first remission after induction therapy containing high-dose cytarabine. *Blood*. 2005;105:481-488.

81. Cassileth PA, Harrington DP, Appelbaum FR, et al. Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. *N Engl J Med*. 1998;339:1649-1656.

82. Suci S, Mandelli F, de Witte T, et al. Allogeneic compared with autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1): an intention-to-treat analysis of the EORTC/GIMEMAAML-10 trial. *Blood*. 2003;102:1232-1240.

83. Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA*. 2009;301:2349-2361.

84. Harousseau JL, Cahn JY, Pignon B, et al. Comparison of autologous bone marrow transplantation and intensive chemotherapy as postremission therapy in adult acute myeloid leukemia. The Groupe Ouest Est Leucemies Aigues Myeloblastiques (GOELAM). *Blood*. 1997;90:2978-2986.

85. Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R, et al. Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups. *N Engl J Med*. 1995;332:217-223.

86. Burnett AK, Goldstone AH, Stevens RM, et al. Randomised comparison of addition of autologous bone-marrow transplantation to intensive chemotherapy for acute myeloid leukaemia in first remission: results of MRC AML 10 trial. UK Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Lancet*. 1998;351:700-708.

87. Breems DA, Lowenberg B. Acute myeloid leukemia and the position of autologous stem cell transplantation. *Semin Hematol*. 2007;44:259-266.

88. Siehl JM, Thiel E, Leben R, Reinwald M, Knauf W, Menssen HD. Quantitative real-time RT-PCR detects elevated Wilms tumor gene (WT1) expression in autologous blood stem cell preparations

(PBSCs) from acute myeloid leukemia (AML) patients indicating contamination with leukemic blasts. *Bone Marrow Transplant*. 2002;29:379-381.

89. Lowenberg B. Strategies in the treatment of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2004;89:1029-1032.
90. Faderl S, Gandhi V, O'Brien S, et al. Results of a phase 1-2 study of clofarabine in combination with cytarabine (ara-C) in relapsed and refractory acute leukemias. *Blood*. 2005;105:940-947.
91. Harousseau JL, Lancet JE, Reiffers J, et al. A phase 2 study of the oral farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in patients with refractory or relapsed acute myeloid leukemia. *Blood*. 2007;109:5151-5156.
92. Lancet JE, Gojo I, Gotlib J, et al. A phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in poor-risk and elderly patients with previously untreated acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2007;109:1387-1394.
93. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, et al. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood*. 2005;105:54-60.
94. Smith BD, Levis M, Beran M, et al. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004;103:3669-3676.
95. Knapper S, Burnett AK, Littlewood T, et al. A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy. *Blood*. 2006;108:3262-3270.
96. DeAngelo DJ, Stone RM, Heaney ML, et al. Phase 1 clinical results with tandutinib (MLN518), a novel FLT3 antagonist, in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Blood*. 2006;108:3674-3681.
97. Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia*. 2000;14:1777-1784.
98. Feuring-Buske M, Frankel AE, Alexander RL, Gerhard B, Hogge DE. A diphtheria toxin-interleukin 3 fusion protein is cytotoxic to primitive acute myeloid leukemia progenitors but spares normal progenitors. *Cancer Res*. 2002;62:1730-1736.
99. Gadhoom Z, Delaunay J, Maquarre E, et al. The effect of anti-CD44 monoclonal antibodies on differentiation and proliferation of human acute myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma*. 2004;45:1501-1510.
100. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med*. 2006;12:1167-1174.
101. Nasr R, Guillemain MC, Ferhi O, et al. Eradication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells through PML-RARA degradation. *Nat Med*. 2008;14:1333-1342.
102. Friedman AD. Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene*. 2002;21:3377-3390.
103. Arinobu Y, Mizuno S, Chong Y, et al. Reciprocal activation of GATA-1 and PU.1 marks initial specification of hematopoietic stem cells into myeloerythroid and myelolymphoid lineages. *Cell Stem Cell*. 2007;1:416-427.
104. Friedman AD. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene*. 2007;26:6816-6828.
105. Klemsz MJ, McKercher SR, Celada A, Van Beveren C, Maki RA. The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell*. 1990;61:113-124.
106. Scott EW, Simon MC, Anastasi J, Singh H. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*. 1994;265:1573-1577.
107. Iwasaki H, Somoza C, Shigematsu H, et al. Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood*. 2005;106:1590-1600.

108. DeKoter RP, Singh H. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science*. 2000;288:1439-1441.
109. Henkel GW, McKercher SR, Leenen PJ, Maki RA. Commitment to the monocytic lineage occurs in the absence of the transcription factor PU.1. *Blood*. 1999;93:2849-2858.
110. Dahl R, Walsh JC, Lancki D, et al. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol*. 2003;4:1029-1036.
111. Laslo P, Spooner CJ, Warmflash A, et al. Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell*. 2006;126:755-766.
112. Rosenbauer F, Wagner K, Kutok JL, et al. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet*. 2004;36:624-630.
113. Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. *Science*. 1989;243:1681-1688.
114. Scott LM, Civin CI, Rorth P, Friedman AD. A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. *Blood*. 1992;80:1725-1735.
115. Traver D, Miyamoto T, Christensen J, Iwasaki-Arai J, Akashi K, Weissman IL. Fetal liver myelopoiesis occurs through distinct, prospectively isolatable progenitor subsets. *Blood*. 2001;98:627-635.
116. Antonson P, Stellan B, Yamanaka R, Xanthopoulos KG. A novel human CCAAT/enhancer binding protein gene, C/EBPepsilon, is expressed in cells of lymphoid and myeloid lineages and is localized on chromosome 14q11.2 close to the T-cell receptor alpha/delta locus. *Genomics*. 1996;35:30-38.
117. Zhang DE, Zhang P, Wang ND, Hetherington CJ, Darlington GJ, Tenen DG. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:569-574.
118. Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, et al. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity*. 2004;21:853-863.
119. Zhang DE, Hetherington CJ, Chen HM, Tenen DG. The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol Cell Biol*. 1994;14:373-381.
120. Smith LT, Hohaus S, Gonzalez DA, Dziennis SE, Tenen DG. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood*. 1996;88:1234-1247.
121. Kummalu T, Friedman AD. Cross-talk between regulators of myeloid development: C/EBPalpha binds and activates the promoter of the PU.1 gene. *J Leukoc Biol*. 2003;74:464-470.
122. Suh HC, Gooya J, Renn K, Friedman AD, Johnson PF, Keller JR. C/EBPalpha determines hematopoietic cell fate in multipotential progenitor cells by inhibiting erythroid differentiation and inducing myeloid differentiation. *Blood*. 2006;107:4308-4316.
123. Umek RM, Friedman AD, McKnight SL. CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science*. 1991;251:288-292.
124. Wang X, Scott E, Sawyers CL, Friedman AD. C/EBPalpha bypasses granulocyte colony-stimulating factor signals to rapidly induce PU.1 gene expression, stimulate granulocytic differentiation, and limit proliferation in 32D cl3 myeloblasts. *Blood*. 1999;94:560-571.
125. Johnson PF. Molecular stop signs: regulation of cell-cycle arrest by C/EBP transcription factors. *J Cell Sci*. 2005;118:2545-2555.
126. Screpanti I, Romani L, Musiani P, et al. Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice. *EMBO J*. 1995;14:1932-1941.
127. Hirai H, Zhang P, Dayaram T, et al. C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. *Nat Immunol*. 2006;7:732-739.

128. Sebastian T, Johnson PF. Stop and go: anti-proliferative and mitogenic functions of the transcription factor C/EBPbeta. *Cell Cycle*. 2006;5:953-957.
129. Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J*. 1997;16:7432-7443.
130. Yamanaka R, Barlow C, Lekstrom-Himes J, et al. Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein epsilon-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:13187-13192.
131. Gombart AF, Shiohara M, Kwok SH, Agematsu K, Komiyama A, Koeffler HP. Neutrophil-specific granule deficiency: homozygous recessive inheritance of a frameshift mutation in the gene encoding transcription factor CCAAT/enhancer binding protein--epsilon. *Blood*. 2001;97:2561-2567.
132. Lord KA, Abdollahi A, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. Proto-oncogenes of the fos/jun family of transcription factors are positive regulators of myeloid differentiation. *Mol Cell Biol*. 1993;13:841-851.
133. Szabo E, Preis LH, Birrer MJ. Constitutive cJun expression induces partial macrophage differentiation in U-937 cells. *Cell Growth Differ*. 1994;5:439-446.
134. Eferl R, Sibilia M, Hilberg F, et al. Functions of c-Jun in liver and heart development. *J Cell Biol*. 1999;145:1049-1061.
135. Passegue E, Jochum W, Schorpp-Kistner M, Mohle-Steinlein U, Wagner EF. Chronic myeloid leukemia with increased granulocyte progenitors in mice lacking junB expression in the myeloid lineage. *Cell*. 2001;104:21-32.
136. Himes SR, Sester DP, Ravasi T, Cronau SL, Sasmono T, Hume DA. The JNK are important for development and survival of macrophages. *J Immunol*. 2006;176:2219-2228.
137. Yoshida K, Miki Y, Kufe D. Activation of SAPK/JNK signaling by protein kinase Cdelta in response to DNA damage. *J Biol Chem*. 2002;277:48372-48378.
138. Moulton KS, Semple K, Wu H, Glass CK. Cell-specific expression of the macrophage scavenger receptor gene is dependent on PU.1 and a composite AP-1/ets motif. *Mol Cell Biol*. 1994;14:4408-4418.
139. Grondin B, Lefrancois M, Tremblay M, et al. c-Jun homodimers can function as a context-specific coactivator. *Mol Cell Biol*. 2007;27:2919-2933.
140. Hoffmann A, Leung TH, Baltimore D. Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities. *EMBO J*. 2003;22:5530-5539.
141. Dunn SM, Coles LS, Lang RK, Gerondakis S, Vadas MA, Shannon MF. Requirement for nuclear factor (NF)-kappa B p65 and NF-interleukin-6 binding elements in the tumor necrosis factor response region of the granulocyte colony-stimulating factor promoter. *Blood*. 1994;83:2469-2479.
142. Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, Baltimore D. Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell*. 1995;80:321-330.
143. Chumakov AM, Silla A, Williamson EA, Koeffler HP. Modulation of DNA binding properties of CCAAT/enhancer binding protein epsilon by heterodimer formation and interactions with NFkappaB pathway. *Blood*. 2007;109:4209-4219.
144. Eisenbeis CF, Singh H, Storb U. Pip, a novel IRF family member, is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator. *Genes Dev*. 1995;9:1377-1387.
145. Meraro D, Hashmueli S, Koren B, et al. Protein-protein and DNA-protein interactions affect the activity of lymphoid-specific IFN regulatory factors. *J Immunol*. 1999;163:6468-6478.
146. Sharf R, Meraro D, Azriel A, et al. Phosphorylation events modulate the ability of interferon consensus sequence binding protein to interact with interferon regulatory factors and to bind DNA. *J Biol Chem*. 1997;272:9785-9792.
147. Kautz B, Kakar R, David E, Eklund EA. SHP1 protein-tyrosine phosphatase inhibits gp91PHOX and p67PHOX expression by inhibiting interaction of PU.1, IRF1, interferon consensus sequence-binding protein, and CREB-binding protein with homologous Cis elements in the CYBB and NCF2 genes. *J Biol Chem*. 2001;276:37868-37878.

148. Holtschke T, Lohler J, Kanno Y, et al. Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene. *Cell*. 1996;87:307-317.
149. Tsujimura H, Nagamura-Inoue T, Tamura T, Ozato K. IFN consensus sequence binding protein/IFN regulatory factor-8 guides bone marrow progenitor cells toward the macrophage lineage. *J Immunol*. 2002;169:1261-1269.
150. de Koning JP, Dong F, Smith L, et al. The membrane-distal cytoplasmic region of human granulocyte colony-stimulating factor receptor is required for STAT3 but not STAT1 homodimer formation. *Blood*. 1996;87:1335-1342.
151. Jankovic V, Ciarrocchi A, Bocconi P, DeBlasio T, Benezra R, Nimer SD. Id1 restrains myeloid commitment, maintaining the self-renewal capacity of hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:1260-1265.
152. Sieweke MH, Tekotte H, Frampton J, Graf T. MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell*. 1996;85:49-60.
153. Kataoka K, Noda M, Nishizawa M. Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun. *Mol Cell Biol*. 1994;14:700-712.
154. Hegde SP, Zhao J, Ashmun RA, Shapiro LH. c-Maf induces monocytic differentiation and apoptosis in bipotent myeloid progenitors. *Blood*. 1999;94:1578-1589.
155. Bakri Y, Sarrazin S, Mayer UP, et al. Balance of MafB and PU.1 specifies alternative macrophage or dendritic cell fate. *Blood*. 2005;105:2707-2716.
156. Aziz A, Vanhille L, Mohideen P, et al. Development of macrophages with altered actin organization in the absence of MafB. *Mol Cell Biol*. 2006;26:6808-6818.
157. Moriguchi T, Hamada M, Morito N, et al. MafB is essential for renal development and F4/80 expression in macrophages. *Mol Cell Biol*. 2006;26:5715-5727.
158. Eklund EA, Jalava A, Kakar R. Tyrosine phosphorylation of HoxA10 decreases DNA binding and transcriptional repression during interferon gamma -induced differentiation of myeloid leukemia cell lines. *J Biol Chem*. 2000;275:20117-20126.
159. Lindsey S, Huang W, Wang H, Horvath E, Zhu C, Eklund EA. Activation of SHP2 protein-tyrosine phosphatase increases HoxA10-induced repression of the genes encoding gp91(PHOX) and p67(PHOX). *J Biol Chem*. 2007;282:2237-2249.
160. Taghon T, Stolz F, De Smedt M, et al. HOX-A10 regulates hematopoietic lineage commitment: evidence for a monocyte-specific transcription factor. *Blood*. 2002;99:1197-1204.
161. Lawrence HJ, Sauvageau G, Ahmadi N, et al. Stage- and lineage-specific expression of the HOXA10 homeobox gene in normal and leukemic hematopoietic cells. *Exp Hematol*. 1995;23:1160-1166.
162. Skalnik DG, Strauss EC, Orkin SH. CCAAT displacement protein as a repressor of the myelomonocytic-specific gp91-phox gene promoter. *J Biol Chem*. 1991;266:16736-16744.
163. Luo W, Skalnik DG. CCAAT displacement protein competes with multiple transcriptional activators for binding to four sites in the proximal gp91phox promoter. *J Biol Chem*. 1996;271:18203-18210.
164. Cadieux C, Fournier S, Peterson AC, Bedard C, Bedell BJ, Nepveu A. Transgenic mice expressing the p75 CCAAT-displacement protein/Cut homeobox isoform develop a myeloproliferative disease-like myeloid leukemia. *Cancer Res*. 2006;66:9492-9501.
165. Karsunky H, Mende I, Schmidt T, Moroy T. High levels of the onco-protein Gfi-1 accelerate T-cell proliferation and inhibit activation induced T-cell death in Jurkat T-cells. *Oncogene*. 2002;21:1571-1579.
166. Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, et al. Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation. *Immunity*. 2003;18:109-120.
167. Duan Z, Horwitz M. Targets of the transcriptional repressor oncoprotein Gfi-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:5932-5937.

168. Grimes HL, Chan TO, Zweidler-McKay PA, Tong B, Tschlis PN. The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol Cell Biol.* 1996;16:6263-6272.
169. Person RE, Li FQ, Duan Z, et al. Mutations in proto-oncogene GFI1 cause human neutropenia and target ELA2. *Nat Genet.* 2003;34:308-312.
170. Crosby SD, Puetz JJ, Simburger KS, Fahrner TJ, Milbrandt J. The early response gene NGFI-C encodes a zinc finger transcriptional activator and is a member of the GCGGGGGCG (GSG) element-binding protein family. *Mol Cell Biol.* 1991;11:3835-3841.
171. Nguyen HQ, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell.* 1993;72:197-209.
172. Krishnaraju K, Hoffman B, Liebermann DA. Early growth response gene 1 stimulates development of hematopoietic progenitor cells along the macrophage lineage at the expense of the granulocyte and erythroid lineages. *Blood.* 2001;97:1298-1305.
173. Lee SL, Wang Y, Milbrandt J. Unimpaired macrophage differentiation and activation in mice lacking the zinc finger transplantation factor NGFI-A (EGR1). *Mol Cell Biol.* 1996;16:4566-4572.
174. Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell.* 1991;65:1255-1266.
175. de The H, Marchio A, Tiollais P, Dejean A. Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor alpha and beta genes. *EMBO J.* 1989;8:429-433.
176. Chih DY, Chumakov AM, Park DJ, Silla AG, Koeffler HP. Modulation of mRNA expression of a novel human myeloid-selective CCAAT/enhancer binding protein gene (C/EBP epsilon). *Blood.* 1997;90:2987-2994.
177. Labrecque J, Allan D, Chambon P, Iscove NN, Lohnes D, Hoang T. Impaired granulocytic differentiation in vitro in hematopoietic cells lacking retinoic acid receptors alpha1 and gamma. *Blood.* 1998;92:607-615.
178. Bush TS, St Coeur M, Resendes KK, Rosmarin AG. GA-binding protein (GABP) and Sp1 are required, along with retinoid receptors, to mediate retinoic acid responsiveness of CD18 (beta 2 leukocyte integrin): a novel mechanism of transcriptional regulation in myeloid cells. *Blood.* 2003;101:311-317.
179. Douer D, Koeffler HP. Retinoic acid enhances growth of human early erythroid progenitor cells in vitro. *J Clin Invest.* 1982;69:1039-1041.
180. Koeffler HP, Amatruda T, Ikekawa N, Kobayashi Y, DeLuca HF. Induction of macrophage differentiation of human normal and leukemic myeloid stem cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its fluorinated analogues. *Cancer Res.* 1984;44:5624-5628.
181. Bastie JN, Balitrand N, Guidez F, et al. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 transrepresses retinoic acid transcriptional activity via vitamin D receptor in myeloid cells. *Mol Endocrinol.* 2004;18:2685-2699.
182. Santini V, Kantarjian HM, Issa JP. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann Intern Med.* 2001;134:573-586.
183. Teofili L, Martini M, Luongo M, et al. Hypermethylation of CpG islands in the promoter region of p15(INK4b) in acute promyelocytic leukemia represses p15(INK4b) expression and correlates with poor prognosis. *Leukemia.* 2003;17:919-924.
184. Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, et al. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood.* 2004;103:1635-1640.
185. Bullinger L, Ehrich M, Dohner K, et al. Quantitative DNA-methylation predicts survival in adult acute myeloid leukemia. *Blood.* 2009.
186. Itzykson R, Gardin C, Fenaux P. Meeting report: myelodysplastic syndromes at ASH 2007. *Leukemia.* 2008;22:893-897.

187. O'Connor OA, Heaney ML, Schwartz L, et al. Clinical experience with intravenous and oral formulations of the novel histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid in patients with advanced hematologic malignancies. *J Clin Oncol*. 2006;24:166-173.
188. Duvic M, Talpur R, Ni X, et al. Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood*. 2007;109:31-39.
189. Kuendgen A, Gattermann N. Valproic acid for the treatment of myeloid malignancies. *Cancer*. 2007;110:943-954.
190. Cimino G, Lo-Coco F, Fenu S, et al. Sequential valproic acid/all-trans retinoic acid treatment reprograms differentiation in refractory and high-risk acute myeloid leukemia. *Cancer Res*. 2006;66:8903-8911.
191. Garcia-Manero G, Yang H, Bueso-Ramos C, et al. Phase 1 study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid [SAHA]) in patients with advanced leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2008;111:1060-1066.
192. Hillestad LK. Acute promyelocytic leukemia. *Acta Med Scand*. 1957;159:189-194.
193. Bernard J, Mathe G, Boulay J, Ceard B, Chome J. [Acute promyelocytic leukemia: a study made on 20 cases.]. *Schweiz Med Wochenschr*. 1959;89:604-608.
194. Cunningham I, Gee TS, Reich LM, Kempin SJ, Naval AN, Clarkson BD. Acute promyelocytic leukemia: treatment results during a decade at Memorial Hospital. *Blood*. 1989;73:1116-1122.
195. Fenaux P, Wang ZZ, Degos L. Treatment of acute promyelocytic leukemia by retinoids. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2007;313:101-128.
196. Sachs L. Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukaemia. *Nature*. 1978;274:535-539.
197. Breitman TR, Selonick SE, Collins SJ. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77:2936-2940.
198. Breitman TR, Collins SJ, Keene BR. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemic cells in primary culture in response to retinoic acid. *Blood*. 1981;57:1000-1004.
199. Flynn PJ, Miller WJ, Weisdorf DJ, Arthur DC, Brunning R, Branda RF. Retinoic acid treatment of acute promyelocytic leukemia: in vitro and in vivo observations. *Blood*. 1983;62:1211-1217.
200. Nilsson B. Probable in vivo induction of differentiation by retinoic acid of promyelocytes in acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1984;57:365-371.
201. Runde V, Aul C, Sudhoff T, Heyll A, Schneider W. Retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia: inefficacy of the 13-cis isomer and induction of complete remission by the all-trans isomer complicated by thromboembolic events. *Ann Hematol*. 1992;64:270-272.
202. Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood*. 2008;111:2505-2515.
203. Fenaux P, Le Deley MC, Castaigne S, et al. Effect of all transretinoic acid in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Results of a multicenter randomized trial. European APL 91 Group. *Blood*. 1993;82:3241-3249.
204. Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, et al. All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: long-term outcome and prognostic factor analysis from the North American Intergroup protocol. *Blood*. 2002;100:4298-4302.
205. Sanz MA, Martin G, Gonzalez M, et al. Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: a multicenter study by the PETHEMA group. *Blood*. 2004;103:1237-1243.
206. Asou N, Kishimoto Y, Kiyoi H, et al. A randomized study with or without intensified maintenance chemotherapy in patients with acute promyelocytic leukemia who have become negative for PML-RARalpha transcript after consolidation therapy: the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) APL97 study. *Blood*. 2007;110:59-66.

207. Ades L, Chevret S, Raffoux E, et al. Is cytarabine useful in the treatment of acute promyelocytic leukemia? Results of a randomized trial from the European Acute Promyelocytic Leukemia Group. *J Clin Oncol*. 2006;24:5703-5710.
208. Schlenk RF, Germing U, Hartmann F, et al. High-dose cytarabine and mitoxantrone in consolidation therapy for acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 2005;19:978-983.
209. Chen GQ, Zhu J, Shi XG, et al. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. *Blood*. 1996;88:1052-1061.
210. Chen GQ, Shi XG, Tang W, et al. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As₂O₃ exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood*. 1997;89:3345-3353.
211. Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, et al. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood*. 1997;89:3354-3360.
212. Niu C, Yan H, Yu T, et al. Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients. *Blood*. 1999;94:3315-3324.
213. Shigeno K, Naito K, Sahara N, et al. Arsenic trioxide therapy in relapsed or refractory Japanese patients with acute promyelocytic leukemia: updated outcomes of the phase II study and postremission therapies. *Int J Hematol*. 2005;82:224-229.
214. Soignet SL, Frankel SR, Douer D, et al. United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2001;19:3852-3860.
215. Lallemand-Breitenbach V, Guillemin MC, Janin A, et al. Retinoic acid and arsenic synergize to eradicate leukemic cells in a mouse model of acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med*. 1999;189:1043-1052.
216. Jing Y, Wang L, Xia L, et al. Combined effect of all-trans retinoic acid and arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood*. 2001;97:264-269.
217. Shen ZX, Shi ZZ, Fang J, et al. All-trans retinoic acid/As₂O₃ combination yields a high quality remission and survival in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:5328-5335.
218. Estey E, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, et al. Use of all-trans retinoic acid plus arsenic trioxide as an alternative to chemotherapy in untreated acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2006;107:3469-3473.
219. Wang G, Li W, Cui J, et al. An efficient therapeutic approach to patients with acute promyelocytic leukemia using a combination of arsenic trioxide with low-dose all-trans retinoic acid. *Hematol Oncol*. 2004;22:63-71.
220. de The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature*. 1990;347:558-561.
221. Kakizuka A, Miller WH, Jr., Umesono K, et al. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell*. 1991;66:663-674.
222. Lo-Coco F, Ammatuna E. The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:156-161, 514.
223. He LZ, Guidez F, Tribioli C, et al. Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with co-repressors determine differential responses to RA in APL. *Nat Genet*. 1998;18:126-135.
224. Kelly LM, Kutok JL, Williams IR, et al. PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:8283-8288.

225. Chan IT, Kutok JL, Williams IR, et al. Oncogenic K-ras cooperates with PML-RAR alpha to induce an acute promyelocytic leukemia-like disease. *Blood*. 2006;108:1708-1715.
226. Chen Z, Brand NJ, Chen A, et al. Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J*. 1993;12:1161-1167.
227. Zheng PZ, Wang KK, Zhang QY, et al. Systems analysis of transcriptome and proteome in retinoic acid/arsenic trioxide-induced cell differentiation/apoptosis of promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:7653-7658.
228. Nervi C, Ferrara FF, Fanelli M, et al. Caspases mediate retinoic acid-induced degradation of the acute promyelocytic leukemia PML/RARalpha fusion protein. *Blood*. 1998;92:2244-2251.
229. Brown D, Kogan S, Lagasse E, et al. A PMLRARalpha transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:2551-2556.
230. vom Baur E, Zechel C, Heery D, et al. Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *EMBO J*. 1996;15:110-124.
231. Kitamura K, Hoshi S, Koike M, Kiyoi H, Saito H, Naoe T. Histone deacetylase inhibitor but not arsenic trioxide differentiates acute promyelocytic leukaemia cells with t(11;17) in combination with all-trans retinoic acid. *Br J Haematol*. 2000;108:696-702.
232. Chen Z, Zhao WL, Shen ZX, et al. Arsenic trioxide and acute promyelocytic leukemia: clinical and biological. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2007;313:129-144.
233. Li J, Chen P, Sinogeeva N, et al. Arsenic trioxide promotes histone H3 phosphoacetylation at the chromatin of CASPASE-10 in acute promyelocytic leukemia cells. *J Biol Chem*. 2002;277:49504-49510.
234. Davison K, Mann KK, Miller WH, Jr. Arsenic trioxide: mechanisms of action. *Semin Hematol*. 2002;39:3-7.
235. Pan XY, Chen GQ, Cai L, Buscemi S, Fu GH. Anion exchanger 2 mediates the action of arsenic trioxide. *Br J Haematol*. 2006;134:491-499.
236. Bernardini S, Nuccetelli M, Noguera NI, et al. Role of GSTP1-1 in mediating the effect of As2O3 in the Acute Promyelocytic Leukemia cell line NB4. *Ann Hematol*. 2006;85:681-687.
237. Ninomiya M, Kajiguchi T, Yamamoto K, Kinoshita T, Emi N, Naoe T. Increased oxidative DNA products in patients with acute promyelocytic leukemia during arsenic therapy. *Haematologica*. 2006;91:1571-1572.
238. Chou WC, Chen HY, Yu SL, Cheng L, Yang PC, Dang CV. Arsenic suppresses gene expression in promyelocytic leukemia cells partly through Sp1 oxidation. *Blood*. 2005;106:304-310.
239. Mathieu J, Besancon F. Arsenic trioxide represses NF-kappaB activation and increases apoptosis in ATRA-treated APL cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1090:203-208.
240. Glienke W, Chow KU, Bauer N, Bergmann L. Down-regulation of wt1 expression in leukemia cell lines as part of apoptotic effect in arsenic treatment using two compounds. *Leuk Lymphoma*. 2006;47:1629-1638.
241. Joe Y, Jeong JH, Yang S, et al. ATR, PML, and CHK2 play a role in arsenic trioxide-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2006;281:28764-28771.
242. Pendino F, Flexor M, Delhommeau F, Buet D, Lanotte M, Segal-Bendirdjian E. Retinoids down-regulate telomerase and telomere length in a pathway distinct from leukemia cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:6662-6667.
243. Tarkanyi I, Dudognon C, Hillion J, et al. Retinoid/arsenic combination therapy of promyelocytic leukemia: induction of telomerase-dependent cell death. *Leukemia*. 2005;19:1806-1811.
244. Zhu J, Lallemand-Breitenbach V, de Thé H. Pathways of retinoic acid- or arsenic trioxide-induced PML/RARalpha catabolism, role of oncogene degradation in disease remission. *Oncogene*. 2001;20:7257-7265.

245. Leung J, Pang A, Yuen WH, Kwong YL, Tse EW. Relationship of expression of aquaglyceroporin 9 with arsenic uptake and sensitivity in leukemia cells. *Blood*. 2007;109:740-746.
246. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:684-700.
247. Holick MF. Vitamin D and bone health. *J Nutr*. 1996;126:1159S-1164S.
248. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res*. 1998;13:325-349.
249. Brenza HL, DeLuca HF. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase gene expression by parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Arch Biochem Biophys*. 2000;381:143-152.
250. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 1988;240:889-895.
251. Yasmin R, Williams RM, Xu M, Noy N. Nuclear import of the retinoid X receptor, the vitamin D receptor, and their mutual heterodimer. *J Biol Chem*. 2005;280:40152-40160.
252. Hsieh JC, Jurutka PW, Galligan MA, et al. Human vitamin D receptor is selectively phosphorylated by protein kinase C on serine 51, a residue crucial to its trans-activation function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:9315-9319.
253. Jurutka PW, Hsieh JC, MacDonald PN, et al. Phosphorylation of serine 208 in the human vitamin D receptor. The predominant amino acid phosphorylated by casein kinase II, in vitro, and identification as a significant phosphorylation site in intact cells. *J Biol Chem*. 1993;268:6791-6799.
254. Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell*. 2007;128:707-719.
255. Mackey SL, Heymont JL, Kronenberg HM, Demay MB. Vitamin D receptor binding to the negative human parathyroid hormone vitamin D response element does not require the retinoid x receptor. *Mol Endocrinol*. 1996;10:298-305.
256. Demay MB, Kiernan MS, DeLuca HF, Kronenberg HM. Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:8097-8101.
257. Murayama A, Kim MS, Yanagisawa J, Takeyama K, Kato S. Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO J*. 2004;23:1598-1608.
258. Fujiki R, Kim MS, Sasaki Y, Yoshimura K, Kitagawa H, Kato S. Ligand-induced transrepression by VDR through association of WSTF with acetylated histones. *EMBO J*. 2005;24:3881-3894.
259. Losel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:46-56.
260. Norman AW. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology*. 2006;147:5542-5548.
261. Huhtakangas JA, Olivera CJ, Bishop JE, Zanello LP, Norman AW. The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 α ,25(OH) $_2$ -vitamin D3 in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol*. 2004;18:2660-2671.
262. Wali RK, Baum CL, Sitrin MD, Brasitus TA. 1,25(OH) $_2$ vitamin D3 stimulates membrane phosphoinositide turnover, activates protein kinase C, and increases cytosolic calcium in rat colonic epithelium. *J Clin Invest*. 1990;85:1296-1303.
263. Morelli S, Buitrago C, Boland R, de Boland AR. The stimulation of MAP kinase by 1,25(OH) $_2$ -vitamin D(3) in skeletal muscle cells is mediated by protein kinase C and calcium. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;173:41-52.
264. Townsend K, Banwell CM, Guy M, et al. Autocrine metabolism of vitamin D in normal and malignant breast tissue. *Clin Cancer Res*. 2005;11:3579-3586.
265. Schwartz GG, Whitlatch LW, Chen TC, Lokeshwar BL, Holick MF. Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D3 from 25-hydroxyvitamin D3. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998;7:391-395.

266. Cross HS, Bareis P, Hofer H, et al. 25-Hydroxyvitamin D(3)-1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. *Steroids*. 2001;66:287-292.
267. Cross HS, Bises G, Lechner D, Manhardt T, Kallay E. The Vitamin D endocrine system of the gut--its possible role in colorectal cancer prevention. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005;97:121-128.
268. Albertson DG, Ylstra B, Segraves R, et al. Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet*. 2000;25:144-146.
269. Weiss MM, Snijders AM, Kuipers EJ, et al. Determination of amplicon boundaries at 20q13.2 in tissue samples of human gastric adenocarcinomas by high-resolution microarray comparative genomic hybridization. *J Pathol*. 2003;200:320-326.
270. Anderson MG, Nakane M, Ruan X, Kroeger PE, Wu-Wong JR. Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006;57:234-240.
271. Banach-Petrosky W, Ouyang X, Gao H, et al. Vitamin D inhibits the formation of prostatic intraepithelial neoplasia in Nkx3.1;Pten mutant mice. *Clin Cancer Res*. 2006;12:5895-5901.
272. Getzenberg RH, Light BW, Lapco PE, et al. Vitamin D inhibition of prostate adenocarcinoma growth and metastasis in the Dunning rat prostate model system. *Urology*. 1997;50:999-1006.
273. Zhang X, Jiang F, Li P, et al. Growth suppression of ovarian cancer xenografts in nude mice by vitamin D analogue EB1089. *Clin Cancer Res*. 2005;11:323-328.
274. Colston KW, Chander SK, Mackay AG, Coombes RC. Effects of synthetic vitamin D analogues on breast cancer cell proliferation in vivo and in vitro. *Biochem Pharmacol*. 1992;44:693-702.
275. Nakagawa K, Kawaura A, Kato S, Takeda E, Okano T. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a preventive factor in the metastasis of lung cancer. *Carcinogenesis*. 2005;26:429-440.
276. Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev*. 1996;10:142-153.
277. Verlinden L, Verstuyf A, Convents R, Marcelis S, Van Camp M, Bouillon R. Action of 1,25(OH)2D3 on the cell cycle genes, cyclin D1, p21 and p27 in MCF-7 cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1998;142:57-65.
278. Hershberger PA, Modzelewski RA, Shurin ZR, Rueger RM, Trump DL, Johnson CS. 1,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25-D3) inhibits the growth of squamous cell carcinoma and down-modulates p21(Waf1/Cip1) in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 1999;59:2644-2649.
279. Jiang F, Li P, Fornace AJ, Jr., Nicosia SV, Bai W. G2/M arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in ovarian cancer cells mediated through the induction of GADD45 via an exonic enhancer. *J Biol Chem*. 2003;278:48030-48040.
280. Palmer HG, Sanchez-Carbayo M, Ordonez-Moran P, Larriba MJ, Cordon-Cardo C, Munoz A. Genetic signatures of differentiation induced by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in human colon cancer cells. *Cancer Res*. 2003;63:7799-7806.
281. Wang QM, Jones JB, Studzinski GP. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a mediator of the G1-S phase block induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in HL60 cells. *Cancer Res*. 1996;56:264-267.
282. Li P, Li C, Zhao X, Zhang X, Nicosia SV, Bai W. p27(Kip1) stabilization and G(1) arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D(3) in ovarian cancer cells mediated through down-regulation of cyclin E/cyclin-dependent kinase 2 and Skp1-Cullin-F-box protein/Skp2 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*. 2004;279:25260-25267.
283. McCarthy DM, San Miguel JF, Freake HC, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits proliferation of human promyelocytic leukaemia (HL60) cells and induces monocyte-macrophage differentiation in HL60 and normal human bone marrow cells. *Leuk Res*. 1983;7:51-55.
284. Abe E, Miyaura C, Sakagami H, et al. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78:4990-4994.

285. Tanaka H, Abe E, Miyaura C, et al. 1 alpha,25-Dihydroxycholecalciferol and a human myeloid leukaemia cell line (HL-60). *Biochem J.* 1982;204:713-719.
286. Olsson I, Gullberg U, Ivhed I, Nilsson K. Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by 1 alpha,25-dihydroxycholecalciferol. *Cancer Res.* 1983;43:5862-5867.
287. Mangelsdorf DJ, Koeffler HP, Donaldson CA, Pike JW, Haussler MR. 1,25-Dihydroxyvitamin D3-induced differentiation in a human promyelocytic leukemia cell line (HL-60): receptor-mediated maturation to macrophage-like cells. *J Cell Biol.* 1984;98:391-398.
288. Zhang DE, Hetherington CJ, Gonzalez DA, Chen HM, Tenen DG. Regulation of CD14 expression during monocytic differentiation induced with 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *J Immunol.* 1994;153:3276-3284.
289. Wang Q, Wang X, Studzinski GP. Jun N-terminal kinase pathway enhances signaling of monocytic differentiation of human leukemia cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Cell Biochem.* 2003;89:1087-1101.
290. Ji Y, Studzinski GP. Retinoblastoma protein and CCAAT/enhancer-binding protein beta are required for 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced monocytic differentiation of HL60 cells. *Cancer Res.* 2004;64:370-377.
291. Gocek E, Kielbinski M, Marcinkowska E. Activation of intracellular signaling pathways is necessary for an increase in VDR expression and its nuclear translocation. *FEBS Lett.* 2007;581:1751-1757.
292. Hmama Z, Nandan D, Sly L, Knutson KL, Herrera-Velit P, Reiner NE. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3)-induced myeloid cell differentiation is regulated by a vitamin D receptor-phosphatidylinositol 3-kinase signaling complex. *J Exp Med.* 1999;190:1583-1594.
293. Guzey M, Luo J, Getzenberg RH. Vitamin D3 modulated gene expression patterns in human primary normal and cancer prostate cells. *J Cell Biochem.* 2004;93:271-285.
294. Chen A, Davis BH, Bissonnette M, Scaglione-Sewell B, Brasitus TA. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) stimulates activator protein-1-dependent Caco-2 cell differentiation. *J Biol Chem.* 1999;274:35505-35513.
295. Fernandez-Garcia NI, Palmer HG, Garcia M, et al. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of Id1 and Id2 genes and the angiogenic phenotype of human colon carcinoma cells. *Oncogene.* 2005;24:6533-6544.
296. Palmer HG, Gonzalez-Sancho JM, Espada J, et al. Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol.* 2001;154:369-387.
297. Ylikomi T, Laaksi I, Lou YR, et al. Antiproliferative action of vitamin D. *Vitam Horm.* 2002;64:357-406.
298. McGuire TF, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D(3)-induced apoptosis of murine squamous cell carcinoma cells. Selective induction of caspase-dependent MEK cleavage and up-regulation of MEKK-1. *J Biol Chem.* 2001;276:26365-26373.
299. Jiang F, Bao J, Li P, Nicosia SV, Bai W. Induction of ovarian cancer cell apoptosis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 through the down-regulation of telomerase. *J Biol Chem.* 2004;279:53213-53221.
300. Chung I, Wong MK, Flynn G, Yu WD, Johnson CS, Trump DL. Differential antiproliferative effects of calcitriol on tumor-derived and matrigel-derived endothelial cells. *Cancer Res.* 2006;66:8565-8573.
301. Merke J, Milde P, Lewicka S, et al. Identification and regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor activity and biosynthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D3. Studies in cultured bovine aortic endothelial cells and human dermal capillaries. *J Clin Invest.* 1989;83:1903-1915.
302. Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB, Canfield AE. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circ Res.* 2000;87:214-220.

303. Cardus A, Parisi E, Gallego C, Aldea M, Fernandez E, Valdivielso JM. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through a VEGF-mediated pathway. *Kidney Int.* 2006;69:1377-1384.
304. Lin R, Nagai Y, Sladek R, et al. Expression profiling in squamous carcinoma cells reveals pleiotropic effects of vitamin D3 analog EB1089 signaling on cell proliferation, differentiation, and immune system regulation. *Mol Endocrinol.* 2002;16:1243-1256.
305. Bao BY, Yao J, Lee YF. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 suppresses interleukin-8-mediated prostate cancer cell angiogenesis. *Carcinogenesis.* 2006;27:1883-1893.
306. Chung I, Karpf AR, Muindi JR, et al. Epigenetic silencing of CYP24 in tumor-derived endothelial cells contributes to selective growth inhibition by calcitriol. *J Biol Chem.* 2007;282:8704-8714.
307. Light BW, Yu WD, McElwain MC, Russell DM, Trump DL, Johnson CS. Potentiation of cisplatin antitumor activity using a vitamin D analogue in a murine squamous cell carcinoma model system. *Cancer Res.* 1997;57:3759-3764.
308. Hershberger PA, Yu WD, Modzelewski RA, Rueger RM, Johnson CS, Trump DL. Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) enhances paclitaxel antitumor activity in vitro and in vivo and accelerates paclitaxel-induced apoptosis. *Clin Cancer Res.* 2001;7:1043-1051.
309. Chaudhry M, Sundaram S, Gennings C, Carter H, Gewirtz DA. The vitamin D3 analog, ILX-23-7553, enhances the response to adriamycin and irradiation in MCF-7 breast tumor cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001;47:429-436.
310. Krishnan AV, Moreno J, Nonn L, et al. Novel pathways that contribute to the anti-proliferative and chemopreventive activities of calcitriol in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007;103:694-702.
311. Beer TM, Ryan CW, Venner PM, et al. Double-blinded randomized study of high-dose calcitriol plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel in androgen-independent prostate cancer: a report from the ASCENT Investigators. *J Clin Oncol.* 2007;25:669-674.
312. Muindi JR, Peng Y, Potter DM, et al. Pharmacokinetics of high-dose oral calcitriol: results from a phase 1 trial of calcitriol and paclitaxel. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;72:648-659.
313. Fakih MG, Trump DL, Muindi JR, et al. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of intravenous calcitriol in combination with oral gefitinib in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2007;13:1216-1223.
314. Bouillon R, Okamura WH, Norman AW. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev.* 1995;16:200-257.
315. Polek TC, Murthy S, Blutt SE, et al. Novel nonsecosteroidal vitamin D receptor modulator inhibits the growth of LNCaP xenograft tumors in athymic mice without increased serum calcium. *Prostate.* 2001;49:224-233.
316. Dalhoff K, Dancy J, Astrup L, et al. A phase II study of the vitamin D analogue Seocalcitol in patients with inoperable hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 2003;89:252-257.
317. Kumagai T, O'Kelly J, Said JW, Koeffler HP. Vitamin D2 analog 19-nor-1,25-dihydroxyvitamin D2: antitumor activity against leukemia, myeloma, and colon cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:896-905.
318. Yee YK, Chintalacheruvu SR, Lu J, Nagpal S. Vitamin D receptor modulators for inflammation and cancer. *Mini Rev Med Chem.* 2005;5:761-778.
319. Ma Y, Khalifa B, Yee YK, et al. Identification and characterization of noncalcemic, tissue-selective, nonsecosteroidal vitamin D receptor modulators. *J Clin Invest.* 2006;116:892-904.
320. Koeffler HP, Hirji K, Itri L. 1,25-Dihydroxyvitamin D3: in vivo and in vitro effects on human preleukemic and leukemic cells. *Cancer Treat Rep.* 1985;69:1399-1407.
321. Richard C, Mazo E, Cuadrado MA, et al. Treatment of myelodysplastic syndrome with 1,25-dihydroxy-vitamin D3. *Am J Hematol.* 1986;23:175-178.
322. Hellstrom E, Robert KH, Samuelsson J, et al. Treatment of myelodysplastic syndromes with retinoic acid and 1 α -hydroxy-vitamin D3 in combination with low-dose ara-C is not superior to

- ara-C alone. Results from a randomized study. The Scandinavian Myelodysplasia Group (SMG). *Eur J Haematol.* 1990;45:255-261.
323. Slapak CA, Desforbes JF, Fogaren T, Miller KB. Treatment of acute myeloid leukemia in the elderly with low-dose cytarabine, hydroxyurea, and calcitriol. *Am J Hematol.* 1992;41:178-183.
324. Ferrero D, Bruno B, Pregno P, et al. Combined differentiating therapy for myelodysplastic syndromes: a phase II study. *Leuk Res.* 1996;20:867-876.
325. Srivastava MD, Ambrus JL. Effect of 1,25(OH)₂ Vitamin D₃ analogs on differentiation induction and cytokine modulation in blasts from acute myeloid leukemia patients. *Leuk Lymphoma.* 2004;45:2119-2126.
326. Kumagai T, Shih LY, Hughes SV, et al. 19-Nor-1,25(OH)₂D₂ (a novel, noncalcemic vitamin D analogue), combined with arsenic trioxide, has potent antitumor activity against myeloid leukemia. *Cancer Res.* 2005;65:2488-2497.
327. Koeffler HP, Aslanian N, O'Kelly J. Vitamin D(2) analog (Paricalcitol; Zemplar) for treatment of myelodysplastic syndrome. *Leuk Res.* 2005;29:1259-1262.
328. Okamoto R, Akagi T, Koeffler P. Vitamin D compounds and myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma.* 2008;49:12-13.
329. Ferrero D, Campa E, Dellacasa C, Campana S, Foli C, Boccadoro M. Differentiating agents + low-dose chemotherapy in the management of old/poor prognosis patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. *Haematologica.* 2004;89:619-620.
330. Yamada K, Mizusawa M, Harima A, et al. Induction of remission of relapsed acute myeloid leukemia after unrelated donor cord blood transplantation by concomitant low-dose cytarabine and calcitriol in adults. *Eur J Haematol.* 2006;77:345-348.
331. Koschmieder S, Agrawal S, Radomska HS, et al. Decitabine and vitamin D₃ differentially affect hematopoietic transcription factors to induce monocytic differentiation. *Int J Oncol.* 2007;30:349-355.
332. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol.* 2004;173:2909-2912.
333. Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *FASEB J.* 2005;19:1067-1077.
334. Gombart AF, O'Kelly J, Saito T, Koeffler HP. Regulation of the CAMP gene by 1,25(OH)₂D₃ in various tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007;103:552-557.
335. Galaris D, Skiada V, Barbouti A. Redox signaling and cancer: the role of "labile" iron. *Cancer Lett.* 2008;266:21-29.
336. Wiese AG, Pacifici RE, Davies KJ. Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys.* 1995;318:231-240.
337. Davies KJ. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life.* 1999;48:41-47.
338. Huang X. Iron overload and its association with cancer risk in humans: evidence for iron as a carcinogenic metal. *Mutat Res.* 2003;533:153-171.
339. Sharp P, Srail SK. Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World J Gastroenterol.* 2007;13:4716-4724.
340. Gunshin H, Starr CN, Drenzo C, et al. Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. *Blood.* 2005;106:2879-2883.
341. Mims MP, Prchal JT. Divalent metal transporter 1. *Hematology.* 2005;10:339-345.
342. Wallander ML, Leibold EA, Eisenstein RS. Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1763:668-689.
343. Latunde-Dada GO, Takeuchi K, Simpson RJ, McKie AT. Haem carrier protein 1 (HCP1): Expression and functional studies in cultured cells. *FEBS Lett.* 2006;580:6865-6870.

344. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*. 2005;122:789-801.
345. Qiu A, Jansen M, Sakaris A, et al. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell*. 2006;127:917-928.
346. Sheftel AD, Zhang AS, Brown C, Shirihaï OS, Ponka P. Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion. *Blood*. 2007;110:125-132.
347. Hugman A. Hepcidin: an important new regulator of iron homeostasis. *Clin Lab Haematol*. 2006;28:75-83.
348. Han O, Kim EY. Colocalization of ferroportin-1 with hephaestin on the basolateral membrane of human intestinal absorptive cells. *J Cell Biochem*. 2007;101:1000-1010.
349. Zoller H, Theurl I, Koch R, Kaser A, Weiss G. Mechanisms of iron mediated regulation of the duodenal iron transporters divalent metal transporter 1 and ferroportin 1. *Blood Cells Mol Dis*. 2002;29:488-497.
350. Nemeth E, Ganz T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr*. 2006;26:323-342.
351. Dunn LL, Rahmanto YS, Richardson DR. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol*. 2007;17:93-100.
352. Andriopoulos B, Jr., Corradini E, Xia Y, et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet*. 2009;41:482-487.
353. Meynard D, Kautz L, Darnaud V, Canonne-Hergaux F, Coppin H, Roth MP. Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet*. 2009;41:478-481.
354. 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.
355. Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, et al. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet*. 2005;37:1264-1269.
356. Roy CN, Penny DM, Feder JN, Enns CA. The hereditary hemochromatosis protein, HFE, specifically regulates transferrin-mediated iron uptake in HeLa cells. *J Biol Chem*. 1999;274:9022-9028.
357. Cheng Y, Zak O, Aisen P, Harrison SC, Walz T. Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell*. 2004;116:565-576.
358. Kawabata H, Yang R, Hiramata T, et al. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem*. 1999;274:20826-20832.
359. Wallace DF, Subramaniam VN. Non-HFE haemochromatosis. *World J Gastroenterol*. 2007;13:4690-4698.
360. Wallace DF, Summerville L, Subramaniam VN. Targeted disruption of the hepatic transferrin receptor 2 gene in mice leads to iron overload. *Gastroenterology*. 2007;132:301-310.
361. Larrick JW, Cresswell P. Modulation of cell surface iron transferrin receptors by cellular density and state of activation. *J Supramol Struct*. 1979;11:579-586.
362. Sutherland R, Delia D, Schneider C, Newman R, Kemshead J, Greaves M. Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78:4515-4519.
363. Taetle R, Honeysett JM. Effects of monoclonal anti-transferrin receptor antibodies on in vitro growth of human solid tumor cells. *Cancer Res*. 1987;47:2040-2044.
364. Trowbridge IS, Lopez F. Monoclonal antibody to transferrin receptor blocks transferrin binding and inhibits human tumor cell growth in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79:1175-1179.
365. Kolberg M, Strand KR, Graff P, Andersson KK. Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1699:1-34.
366. Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, Kuo F, Andrews NC. Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat Genet*. 1999;21:396-399.

367. Richardson DR, Baker E. The uptake of iron and transferrin by the human malignant melanoma cell. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1053:1-12.
368. Richardson DR, Baker E. Two saturable mechanisms of iron uptake from transferrin in human melanoma cells: the effect of transferrin concentration, chelators, and metabolic probes on transferrin and iron uptake. *J Cell Physiol*. 1994;161:160-168.
369. Trinder D, Zak O, Aisen P. Transferrin receptor-independent uptake of diferric transferrin by human hepatoma cells with antisense inhibition of receptor expression. *Hepatology*. 1996;23:1512-1520.
370. O'Donnell KA, Yu D, Zeller KI, et al. Activation of transferrin receptor 1 by c-Myc enhances cellular proliferation and tumorigenesis. *Mol Cell Biol*. 2006;26:2373-2386.
371. Brookes MJ, Hughes S, Turner FE, et al. Modulation of iron transport proteins in human colorectal carcinogenesis. *Gut*. 2006;55:1449-1460.
372. Habashy HO, Powe DG, Staka CM, et al. Transferrin receptor (CD71) is a marker of poor prognosis in breast cancer and can predict response to tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat*. 2009.
373. Kawabata H, Germain RS, Vuong PT, Nakamaki T, Said JW, Koeffler HP. Transferrin receptor 2-alpha supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo. *J Biol Chem*. 2000;275:16618-16625.
374. Suryo Rahmanto Y, Dunn LL, Richardson DR. The melanoma tumor antigen, melanotransferrin (p97): a 25-year hallmark--from iron metabolism to tumorigenesis. *Oncogene*. 2007;26:6113-6124.
375. Hann HW, Levy HM, Evans AE. Serum ferritin as a guide to therapy in neuroblastoma. *Cancer Res*. 1980;40:1411-1413.
376. Marcus DM, Zinberg N. Measurement of serum ferritin by radioimmunoassay: results in normal individuals and patients with breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1975;55:791-795.
377. Kew MC, Torrance JD, Derman D, et al. Serum and tumour ferritins in primary liver cancer. *Gut*. 1978;19:294-299.
378. Kikyo N, Suda M, Hagiwara K, et al. Purification and characterization of a cell growth factor from a human leukemia cell line: immunological identity with ferritin. *Cancer Res*. 1994;54:268-271.
379. Kikyo N, Hagiwara K, Fujisawa M, Yazaki Y, Okabe T. Purification of a cell growth factor from a human lung cancer cell line: its relationship with ferritin. *J Cell Physiol*. 1994;161:106-110.
380. Bretscher MS, Thomson JN. Distribution of ferritin receptors and coated pits on giant HeLa cells. *EMBO J*. 1983;2:599-603.
381. Jordan A, Reichard P. Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:71-98.
382. Nakano K, Balint E, Ashcroft M, Vousden KH. A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73. *Oncogene*. 2000;19:4283-4289.
383. Yu Y, Kovacevic Z, Richardson DR. Tuning cell cycle regulation with an iron key. *Cell Cycle*. 2007;6:1982-1994.
384. Fu D, Richardson DR. 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*. 2007;110:752-761.
385. Richardson D, Ponka P, Baker E. The effect of the iron(III) chelator, desferrioxamine, on iron and transferrin uptake by the human malignant melanoma cell. *Cancer Res*. 1994;54:685-689.
386. Becton DL, Bryles P. Deferoxamine inhibition of human neuroblastoma viability and proliferation. *Cancer Res*. 1988;48:7189-7192.
387. Blatt J, Stitely S. Antineuroblastoma activity of desferoxamine in human cell lines. *Cancer Res*. 1987;47:1749-1750.
388. Donfrancesco A, Deb G, Dominici C, Pileggi D, Castello MA, Helson L. Effects of a single course of deferoxamine in neuroblastoma patients. *Cancer Res*. 1990;50:4929-4930.

389. Donfrancesco A, De Bernardi B, Carli M, et al. Deferoxamine followed by cyclophosphamide, etoposide, carboplatin, thiotepa, induction regimen in advanced neuroblastoma: preliminary results. Italian Neuroblastoma Cooperative Group. *Eur J Cancer*. 1995;31A:612-615.
390. Blatt J. Deferoxamine in children with recurrent neuroblastoma. *Anticancer Res*. 1994;14:2109-2112.
391. Selig RA, White L, Gramacho C, Sterling-Levis K, Fraser IW, Naidoo D. Failure of iron chelators to reduce tumor growth in human neuroblastoma xenografts. *Cancer Res*. 1998;58:473-478.
392. Samuni AM, Krishna MC, DeGraff W, et al. Mechanisms underlying the cytotoxic effects of Tachpyr--a novel metal chelator. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1571:211-218.
393. Abeysinghe RD, Greene BT, Haynes R, et al. p53-independent apoptosis mediated by tachpyridine, an anti-cancer iron chelator. *Carcinogenesis*. 2001;22:1607-1614.
394. Nick H, Acklin P, Lattmann R, et al. Development of tridentate iron chelators: from desferrithiocin to ICL670. *Curr Med Chem*. 2003;10:1065-1076.
395. Chantrel-Groussard K, Gaboriau F, Pasdeloup N, et al. The new orally active iron chelator ICL670A exhibits a higher antiproliferative effect in human hepatocyte cultures than O-trensox. *Eur J Pharmacol*. 2006;541:129-137.
396. Lescoat G, Chantrel-Groussard K, Pasdeloup N, Nick H, Brissot P, Gaboriau F. Antiproliferative and apoptotic effects in rat and human hepatoma cell cultures of the orally active iron chelator ICL670 compared to CP20: a possible relationship with polyamine metabolism. *Cell Prolif*. 2007;40:755-767.
397. Ponka P, Borova J, Neuwirt J, Fuchs O. Mobilization of iron from reticulocytes. Identification of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone as a new iron chelating agent. *FEBS Lett*. 1979;97:317-321.
398. Baker E, Vitolo ML, Webb J. Iron chelation by pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and analogues in hepatocytes in culture. *Biochem Pharmacol*. 1985;34:3011-3017.
399. Richardson DR, Baker E. The release of iron and transferrin from the human melanoma cell. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1091:294-302.
400. Richardson DR, Ponka P. The iron metabolism of the human neuroblastoma cell: lack of relationship between the efficacy of iron chelation and the inhibition of DNA synthesis. *J Lab Clin Med*. 1994;124:660-671.
401. Richardson DR, Tran EH, Ponka P. The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents. *Blood*. 1995;86:4295-4306.
402. Gao J, Richardson DR. The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents, IV: The mechanisms involved in inhibiting cell-cycle progression. *Blood*. 2001;98:842-850.
403. Le NT, Richardson DR. 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*. 2004;104:2967-2975.
404. Chaston TB, Watts RN, Yuan J, Richardson DR. Potent antitumor activity of novel iron chelators derived from di-2-pyridylketone isonicotinoyl hydrazone involves fenton-derived free radical generation. *Clin Cancer Res*. 2004;10:7365-7374.
405. Sartorelli AC, Agrawal KC, Moore EC. Mechanism of inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by α -(N)-heterocyclic aldehyde thiosemicarbazones. *Biochem Pharmacol*. 1971;20:3119-3123.
406. Agrawal KC, Sartorelli AC. The chemistry and biological activity of α -(N)-heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones. *Prog Med Chem*. 1978;15:321-356.
407. Shao J, Zhou B, Di Bilio AJ, et al. A Ferrous-Triapine complex mediates formation of reactive oxygen species that inactivate human ribonucleotide reductase. *Mol Cancer Ther*. 2006;5:586-592.
408. Cooper CE, Lynagh GR, Hoyes KP, Hider RC, Cammack R, Porter JB. The relationship of intracellular iron chelation to the inhibition and regeneration of human ribonucleotide reductase. *J Biol Chem*. 1996;271:20291-20299.

409. Wadler S, Makower D, Clairmont C, Lambert P, Fehn K, Sznol M. Phase I and pharmacokinetic study of the ribonucleotide reductase inhibitor, 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone, administered by 96-hour intravenous continuous infusion. *J Clin Oncol.* 2004;22:1553-1563.
410. Foltz LM, Dalal BI, Wadsworth LD, et al. Recognition and management of methemoglobinemia and hemolysis in a G6PD-deficient patient on experimental anticancer drug Triapine. *Am J Hematol.* 2006;81:210-211.
411. Gojo I, Tidwell ML, Greer J, et al. Phase I and pharmacokinetic study of Triapine, a potent ribonucleotide reductase inhibitor, in adults with advanced hematologic malignancies. *Leuk Res.* 2007;31:1165-1173.
412. Knox JJ, Hotte SJ, Kollmannsberger C, Winqvist E, Fisher B, Eisenhauer EA. Phase II study of Triapine in patients with metastatic renal cell carcinoma: a trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC IND.161). *Invest New Drugs.* 2007;25:471-477.
413. Mackenzie MJ, Saltman D, Hirte H, et al. A Phase II study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) and gemcitabine in advanced pancreatic carcinoma. A trial of the Princess Margaret hospital Phase II consortium. *Invest New Drugs.* 2007;25:553-558.
414. Yuan J, Lovejoy DB, Richardson DR. Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: in vitro and in vivo assessment. *Blood.* 2004;104:1450-1458.
415. Whitnall M, Howard J, Ponka P, Richardson DR. 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.* 2006;103:14901-14906.
416. Kalinowski DS, Yu Y, Sharpe PC, et al. Design, synthesis, and characterization of novel iron chelators: structure-activity relationships of the 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone series and their 3-nitrobenzoyl analogues as potent antitumor agents. *J Med Chem.* 2007;50:3716-3729.
417. Bernhardt PV, Caldwell LM, Chaston TB, Chin P, Richardson DR. Cytotoxic iron chelators: characterization of the structure, solution chemistry and redox activity of ligands and iron complexes of the di-2-pyridyl ketone isonicotinoyl hydrazone (HPKIH) analogues. *J Biol Inorg Chem.* 2003;8:866-880.
418. Becker EM, Lovejoy DB, Greer JM, Watts R, Richardson DR. Identification of the di-pyridyl ketone isonicotinoyl hydrazone (PKIH) analogues as potent iron chelators and anti-tumour agents. *Br J Pharmacol.* 2003;138:819-830.
419. Kalinowski DS, Sharpe PC, Bernhardt PV, Richardson DR. Design, synthesis, and characterization of new iron chelators with anti-proliferative activity: structure-activity relationships of novel thiohydrazone analogues. *J Med Chem.* 2007;50:6212-6225.
420. Daniels TR, Delgado T, Rodriguez JA, Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin Immunol.* 2006;121:144-158.
421. Singh M, Atwal H, Micetich R. Transferrin directed delivery of adriamycin to human cells. *Anticancer Res.* 1998;18:1423-1427.
422. Berczi A, Barabas K, Sizensky JA, Faulk WP. Adriamycin conjugates of human transferrin bind transferrin receptors and kill K562 and HL60 cells. *Arch Biochem Biophys.* 1993;300:356-363.
423. Sun IL, Sun EE, Crane FL, Morre DJ, Faulk WP. Inhibition of transplasma membrane electron transport by transferrin-adriamycin conjugates. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1105:84-88.
424. Fritzer M, Barabas K, Szuts V, et al. Cytotoxicity of a transferrin-adriamycin conjugate to anthracycline-resistant cells. *Int J Cancer.* 1992;52:619-623.
425. Hatano T, Ohkawa K, Matsuda M. Cytotoxic effect of the protein-doxorubicin conjugates on the multidrug-resistant human myelogenous leukemia cell line, K562, in vitro. *Tumour Biol.* 1993;14:288-294.
426. Fritzer M, Szekeres T, Szuts V, Jarayam HN, Goldenberg H. Cytotoxic effects of a doxorubicin-transferrin conjugate in multidrug-resistant KB cells. *Biochem Pharmacol.* 1996;51:489-493.

427. Wang F, Jiang X, Yang DC, Elliott RL, Head JF. Doxorubicin-gallium-transferrin conjugate overcomes multidrug resistance: evidence for drug accumulation in the nucleus of drug resistant MCF-7/ADR cells. *Anticancer Res.* 2000;20:799-808.
428. Chitambar CR. Gallium compounds as antineoplastic agents. *Curr Opin Oncol.* 2004;16:547-552.
429. Elliott RL, Stjernholm R, Elliott MC. Preliminary evaluation of platinum transferrin (MPTC-63) as a potential nontoxic treatment for breast cancer. *Cancer Detect Prev.* 1988;12:469-480.
430. Hoshino T, Misaki M, Yamamoto M, Shimizu H, Ogawa Y, Toguchi H. In vitro cytotoxicities and in vivo distribution of transferrin-platinum(II) complex. *J Pharm Sci.* 1995;84:216-221.
431. Head JF, Wang F, Elliott RL. Antineoplastic drugs that interfere with iron metabolism in cancer cells. *Adv Enzyme Regul.* 1997;37:147-169.
432. Beyer U, Roth T, Schumacher P, et al. Synthesis and in vitro efficacy of transferrin conjugates of the anticancer drug chlorambucil. *J Med Chem.* 1998;41:2701-2708.
433. Tanaka T, Shiramoto S, Miyashita M, Fujishima Y, Kaneo Y. Tumor targeting based on the effect of enhanced permeability and retention (EPR) and the mechanism of receptor-mediated endocytosis (RME). *Int J Pharm.* 2004;277:39-61.
434. Daniels TR, Delgado T, Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells. *Clin Immunol.* 2006;121:159-176.
435. Raso V, Basala M. A highly cytotoxic human transferrin-ricin A chain conjugate used to select receptor-modified cells. *J Biol Chem.* 1984;259:1143-1149.
436. Chignola R, Feroni R, Franceschi A, et al. Heterogeneous response of individual multicellular tumour spheroids to immunotoxins and ricin toxin. *Br J Cancer.* 1995;72:607-614.
437. Johnson VG, Wrobel C, Wilson D, et al. Improved tumor-specific immunotoxins in the treatment of CNS and leptomeningeal neoplasia. *J Neurosurg.* 1989;70:240-248.
438. Martell LA, Agrawal A, Ross DA, Muraszko KM. Efficacy of transferrin receptor-targeted immunotoxins in brain tumor cell lines and pediatric brain tumors. *Cancer Res.* 1993;53:1348-1353.
439. Laske DW, Ilcercil O, Akbasak A, Youle RJ, Oldfield EH. Efficacy of direct intratumoral therapy with targeted protein toxins for solid human gliomas in nude mice. *J Neurosurg.* 1994;80:520-526.
440. Laske DW, Youle RJ, Oldfield EH. Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors. *Nat Med.* 1997;3:1362-1368.
441. Weaver M, Laske DW. Transferrin receptor ligand-targeted toxin conjugate (Tf-CRM107) for therapy of malignant gliomas. *J Neurooncol.* 2003;65:3-13.
442. Kurasa M, Walker GF, Roessler V, et al. Novel shielded transferrin-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer. *Bioconjug Chem.* 2003;14:222-231.
443. Chiu SJ, Liu S, Perrotti D, Marcucci G, Lee RJ. Efficient delivery of a Bcl-2-specific antisense oligodeoxyribonucleotide (G3139) via transferrin receptor-targeted liposomes. *J Control Release.* 2006;112:199-207.
444. Nakase M, Inui M, Okumura K, Kamei T, Nakamura S, Tagawa T. p53 gene therapy of human osteosarcoma using a transferrin-modified cationic liposome. *Mol Cancer Ther.* 2005;4:625-631.
445. Oh KS, Engler JA, Joung I. Enhancement of gene delivery to cancer cells by a retargeted adenovirus. *J Microbiol.* 2005;43:179-182.
446. Sahoo SK, Ma W, Labhasetwar V. Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer. *Int J Cancer.* 2004;112:335-340.
447. Trowbridge IS, Lesley J, Schulte R. Murine cell surface transferrin receptor: studies with an anti-receptor monoclonal antibody. *J Cell Physiol.* 1982;112:403-410.
448. Trowbridge IS, Collawn J, Jing S, White S, Esekogwu V, Stangel M. Structure-function analysis of the human transferrin receptor: effects of anti-receptor monoclonal antibodies on tumor growth. *Curr Stud Hematol Blood Transfus.* 1991:139-147.

449. Lesley JF, Schulte RJ. Inhibition of cell growth by monoclonal anti-transferrin receptor antibodies. *Mol Cell Biol.* 1985;5:1814-1821.
450. Kemp JD, Cardillo T, Stewart BC, et al. Inhibition of lymphoma growth in vivo by combined treatment with hydroxyethyl starch deferoxamine conjugate and IgG monoclonal antibodies against the transferrin receptor. *Cancer Res.* 1995;55:3817-3824.
451. Taetle R, Honeysett JM, Trowbridge I. Effects of anti-transferrin receptor antibodies on growth of normal and malignant myeloid cells. *Int J Cancer.* 1983;32:343-349.
452. Petrini M, Pelosi-Testa E, Sposi NM, et al. Constitutive expression and abnormal glycosylation of transferrin receptor in acute T-cell leukemia. *Cancer Res.* 1989;49:6989-6996.
453. Trowbridge IS, Omary MB. Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78:3039-3043.
454. Taetle R, Castagnola J, Mendelsohn J. Mechanisms of growth inhibition by anti-transferrin receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 1986;46:1759-1763.
455. White S, Taetle R, Seligman PA, Rutherford M, Trowbridge IS. Combinations of anti-transferrin receptor monoclonal antibodies inhibit human tumor cell growth in vitro and in vivo: evidence for synergistic antiproliferative effects. *Cancer Res.* 1990;50:6295-6301.
456. Laske DW, Muraszko KM, Oldfield EH, et al. Intraventricular immunotoxin therapy for leptomeningeal neoplasia. *Neurosurgery.* 1997;41:1039-1049; discussion 1049-1051.
457. 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;1:1259-1265.
458. Qing Y, Shuo W, Zhihua W, et al. The in vitro antitumor effect and in vivo tumor-specificity distribution of human-mouse chimeric antibody against transferrin receptor. *Cancer Immunol Immunother.* 2006;55:1111-1121.
459. Ng PP, Dela Cruz JS, Sorour DN, 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 U S A.* 2002;99:10706-10711.
460. Ortiz-Sanchez E, Daniels TR, Helguera G, Martinez-Maza O, Bonavida B, Penichet ML. Enhanced cytotoxicity of an anti-transferrin receptor IgG3-avidin fusion protein in combination with gambogic acid against human malignant hematopoietic cells: functional relevance of iron, the receptor, and reactive oxygen species. *Leukemia.* 2009;23:59-70.
461. Moura IC, Centelles MN, Arcos-Fajardo M, 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.
462. Moura IC, Lepelletier Y, Arnulf B, et al. A neutralizing monoclonal antibody (mAb A24) directed against the transferrin receptor induces apoptosis of tumor T lymphocytes from ATL patients. *Blood.* 2004;103:1838-1845.
463. Lepelletier Y, Camara-Clayette V, Jin H, et al. Prevention of mantle lymphoma tumor establishment by routing transferrin receptor toward lysosomal compartments. *Cancer Res.* 2007;67:1145-1154.
464. Zhang DE, Hetherington CJ, Tan S, et al. Sp1 is a critical factor for the monocytic specific expression of human CD14. *J Biol Chem.* 1994;269:11425-11434.
465. Danilenko M, Wang Q, Wang X, Levy J, Sharoni Y, Studzinski GP. Carnosic acid potentiates the antioxidant and prodifferentiation effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in leukemia cells but does not promote elevation of basal levels of intracellular calcium. *Cancer Res.* 2003;63:1325-1332.
466. Richardson DR, Kalinowski DS, Lau S, Jansson PJ, Lovejoy DB. Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumour agents. *Biochim Biophys Acta.* 2008.
467. Ohyashiki JH, Kobayashi C, Hamamura R, Okabe S, Tauchi T, Ohyashiki K. The oral iron chelator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemia cells by enhancing expression of REDD1. *Cancer Sci.* 2009;100:970-977.

468. Kurmasheva RT, Huang S, Houghton PJ. Predicted mechanisms of resistance to mTOR inhibitors. *Br J Cancer*. 2006;95:955-960.
469. Tamburini J, Chapuis N, Bardet V, et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways. *Blood*. 2008;111:379-382.
470. Tamburini J, Green AS, Bardet V, et al. Protein synthesis is resistant to rapamycin and constitutes a promising therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2009;114:1618-1627.
471. Wang J, Zhao Y, Kauss MA, Spindel S, Lian H. Akt regulates vitamin D3-induced leukemia cell functional differentiation via Raf/MEK/ERK MAPK signaling. *Eur J Cell Biol*. 2009;88:103-115.
472. Schwarzer R, Tondera D, Arnold W, Giese K, Klippel A, Kaufmann J. REDD1 integrates hypoxia-mediated survival signaling downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene*. 2005;24:1138-1149.
473. Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ*. 2008;15:678-685.
474. Guo M, Song LP, Jiang Y, Liu W, Yu Y, Chen GQ. Hypoxia-mimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1 α independent mechanisms. *Apoptosis*. 2006;11:67-77.
475. Yan H, Peng ZG, Wu YL, et al. Hypoxia-simulating agents and selective stimulation of arsenic trioxide-induced growth arrest and cell differentiation in acute promyelocytic leukemic cells. *Haematologica*. 2005;90:1607-1616.
476. Zhang J, Song LP, Huang Y, Zhao Q, Zhao KW, Chen GQ. Accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α protein and its role in the differentiation of myeloid leukemic cells induced by all-trans retinoic acid. *Haematologica*. 2008;93:1480-1487.
477. Chaston TB, Lovejoy DB, Watts RN, Richardson DR. Examination of the antiproliferative activity of iron chelators: multiple cellular targets and the different mechanism of action of triapine compared with desferrioxamine and the potent pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogue 311. *Clin Cancer Res*. 2003;9:402-414.
478. Ishii KA, Fumoto T, Iwai K, et al. Coordination of PGC-1 β and iron uptake in mitochondrial biogenesis and osteoclast activation. *Nat Med*. 2009;15:259-266.
479. Iiyama M, Kakihana K, Kurosu T, Miura O. Reactive oxygen species generated by hematopoietic cytokines play roles in activation of receptor-mediated signaling and in cell cycle progression. *Cell Signal*. 2006;18:174-182.
480. Sattler M, Winkler T, Verma S, et al. Hematopoietic growth factors signal through the formation of reactive oxygen species. *Blood*. 1999;93:2928-2935.
481. Owusu-Ansah E, Banerjee U. Reactive oxygen species prime *Drosophila* hematopoietic progenitors for differentiation. *Nature*. 2009;461:537-541.
482. Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell*. 2007;128:325-339.
483. Gu TL, Tothova Z, Scheijen B, Griffin JD, Gilliland DG, Sternberg DW. NPM-ALK fusion kinase of anaplastic large-cell lymphoma regulates survival and proliferative signaling through modulation of FOXO3a. *Blood*. 2004;103:4622-4629.
484. Komatsu N, Watanabe T, Uchida M, et al. A member of Forkhead transcription factor FKHRL1 is a downstream effector of STI571-induced cell cycle arrest in BCR-ABL-expressing cells. *J Biol Chem*. 2003;278:6411-6419.
485. Scheijen B, Ngo HT, Kang H, Griffin JD. FLT3 receptors with internal tandem duplications promote cell viability and proliferation by signaling through Foxo proteins. *Oncogene*. 2004;23:3338-3349.
486. Kharas MG, Okabe R, Ganis JJ, et al. Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice. *Blood*. 2009.

487. Rizo A, Olthof S, Han L, Vellenga E, de Haan G, Schuringa JJ. Repression of BMI1 in normal and leukemic human CD34(+) cells impairs self-renewal and induces apoptosis. *Blood*. 2009;114:1498-1505.
488. Yamamoto T, Sakaguchi N, Hachiya M, Nakayama F, Yamakawa M, Akashi M. Role of catalase in monocytic differentiation of U937 cells by TPA: hydrogen peroxide as a second messenger. *Leukemia*. 2009;23:761-769.
489. Forman HJ, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:S4-8.
490. Iles KE, Forman HJ. Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunol Res*. 2002;26:95-105.
491. Datta R, Yoshinaga K, Kaneki M, Pandey P, Kufe D. Phorbol ester-induced generation of reactive oxygen species is protein kinase cbeta -dependent and required for SAPK activation. *J Biol Chem*. 2000;275:41000-41003.
492. Wang Q, Salman H, Danilenko M, Studzinski GP. Cooperation between antioxidants and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in induction of leukemia HL60 cell differentiation through the JNK/AP-1/Egr-1 pathway. *J Cell Physiol*. 2005;204:964-974.
493. Esposito F, Agosti V, Morrone G, et al. Inhibition of the differentiation of human myeloid cell lines by redox changes induced through glutathione depletion. *Biochem J*. 1994;301 (Pt 3):649-653.
494. Richard D, Hollender P, Chenais B. Butyric acid increases invasiveness of HL-60 leukemia cells: role of reactive oxygen species. *FEBS Lett*. 2002;518:159-163.
495. Chau YP, Shiah SG, Don MJ, Kuo ML. Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor beta-lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. *Free Radic Biol Med*. 1998;24:660-670.
496. Koren R, Hadari-Naor I, Zuck E, Rotem C, Liberman UA, Ravid A. Vitamin D is a prooxidant in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2001;61:1439-1444.
497. Hartmann C, Corre-Menguy F, Boualem A, Jovanovic M, Lelandais-Briere C. [MicroRNAs: a new class of gene expression regulators]. *Med Sci (Paris)*. 2004;20:894-898.
498. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*. 2004;303:83-86.
499. Wang X, Gocek E, Liu CG, Studzinski GP. MicroRNAs181 regulate the expression of p27Kip1 in human myeloid leukemia cells induced to differentiate by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Cell Cycle*. 2009;8:736-741.
500. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*. 2008;451:1125-1129.
501. Fazi F, Racanicchi S, Zardo G, et al. Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein. *Cancer Cell*. 2007;12:457-466.
502. Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, et al. MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*. 2007;26:4148-4157.
503. Bousquet M, Quelen C, Rosati R, et al. Myeloid cell differentiation arrest by miR-125b-1 in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with the t(2;11)(p21;q23) translocation. *J Exp Med*. 2008;205:2499-2506.
504. Mohri T, Nakajima M, Takagi S, Komagata S, Yokoi T. MicroRNA regulates human vitamin D receptor. *Int J Cancer*. 2009;125:1328-1333.
505. Schaar DG, Medina DJ, Moore DF, Strair RK, Ting Y. miR-320 targets transferrin receptor 1 (CD71) and inhibits cell proliferation. *Exp Hematol*. 2009;37:245-255.
506. Eberhard Y, McDermott SP, Wang X, et al. Chelation of intracellular iron with the antifungal agent ciclopirox olamine induces cell death in leukemia and myeloma cells. *Blood*. 2009;114:3064-3073.
507. Winder A, Lefkowitz R, Ghoti H, et al. Urinary hepcidin excretion in patients with myelodysplastic syndrome and myelofibrosis. *Br J Haematol*. 2008;142:669-671.

508. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med.* 2007;13:1096-1101.
509. Cabantchik ZI, Breuer W, Zanninelli G, Cianciulli P. LPI-labile plasma iron in iron overload. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005;18:277-287.
510. Durken M, Nielsen P, Knobel S, et al. Nontransferrin-bound iron in serum of patients receiving bone marrow transplants. *Free Radic Biol Med.* 1997;22:1159-1163.
511. Sahlstedt L, Ebeling F, von Bonsdorff L, Parkkinen J, Ruutu T. Non-transferrin-bound iron during allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2001;113:836-838.
512. Bradley SJ, Gosriwitana I, Srichairatanakool S, Hider RC, Porter JB. Non-transferrin-bound iron induced by myeloablative chemotherapy. *Br J Haematol.* 1997;99:337-343.
513. Modell B, Khan M, Darlison M. Survival in beta-thalassaemia major in the UK: data from the UK Thalassaemia Register. *Lancet.* 2000;355:2051-2052.
514. Olivieri NF, Nathan DG, MacMillan JH, et al. Survival in medically treated patients with homozygous beta-thalassemia. *N Engl J Med.* 1994;331:574-578.
515. Steensma DP. Myelodysplasia paranoia: iron as the new radon. *Leuk Res.* 2009;33:1158-1163.
516. Alessandrino EP, Amadori S, Barosi G, et al. Evidence- and consensus-based practice guidelines for the therapy of primary myelodysplastic syndromes. A statement from the Italian Society of Hematology. *Haematologica.* 2002;87:1286-1306.
517. Bowen D, Culligan D, Jowitt S, et al. Guidelines for the diagnosis and therapy of adult myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 2003;120:187-200.
518. Bennett JM. Consensus statement on iron overload in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol.* 2008;83:858-861.
519. Suzuki T, Tomonaga M, Miyazaki Y, et al. Japanese epidemiological survey with consensus statement on Japanese guidelines for treatment of iron overload in bone marrow failure syndromes. *Int J Hematol.* 2008;88:30-35.
520. Chacko J, Pennell DJ, Tanner MA, et al. Myocardial iron loading by magnetic resonance imaging T2* in good prognostic myelodysplastic syndrome patients on long-term blood transfusions. *Br J Haematol.* 2007;138:587-593.
521. Konen E, Ghoti H, Goitein O, et al. No evidence for myocardial iron overload in multitransfused patients with myelodysplastic syndrome using cardiac magnetic resonance T2 technique. *Am J Hematol.* 2007;82:1013-1016.
522. Chee CE, Steensma DP, Wu W, Hanson CA, Tefferi A. Neither serum ferritin nor the number of red blood cell transfusions affect overall survival in refractory anemia with ringed sideroblasts. *Am J Hematol.* 2008;83:611-613.
523. Caroline L, Rosner F, Kozinn PJ. Elevated serum iron, low unbound transferrin and candidiasis in acute leukemia. *Blood.* 1969;34:441-451.
524. Karp JE, Merz WG. Association of reduced total iron binding capacity and fungal infections in leukemic granulocytopenic patients. *J Clin Oncol.* 1986;4:216-220.
525. von Bonsdorff L, Sahlstedt L, Ebeling F, Ruutu T, Parkkinen J. Apotransferrin administration prevents growth of *Staphylococcus epidermidis* in serum of stem cell transplant patients by binding of free iron. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;37:45-51.
526. Ghoti H, Amer J, Winder A, Rachmilewitz E, Fibach E. Oxidative stress in red blood cells, platelets and polymorphonuclear leukocytes from patients with myelodysplastic syndrome. *Eur J Haematol.* 2007;79:463-467.
527. Boelaert JR, de Locht M, Van Cutsem J, et al. Mucormycosis during deferoxamine therapy is a siderophore-mediated infection. In vitro and in vivo animal studies. *J Clin Invest.* 1993;91:1979-1986.
528. Ibrahim AS, Spellberg B, Edwards J, Jr. Iron acquisition: a novel perspective on mucormycosis pathogenesis and treatment. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;21:620-625.
529. Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 1995;374:1-5.

530. Pullarkat V, Blanchard S, Tegtmeier B, et al. Iron overload adversely affects outcome of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2008;42:799-805.
531. Platzbecker U, Bornhauser M, Germing U, et al. Red blood cell transfusion dependence and outcome after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in patients with de novo myelodysplastic syndrome (MDS). *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14:1217-1225.
532. Armand P, Kim HT, Cutler CS, et al. Prognostic impact of elevated pretransplantation serum ferritin in patients undergoing myeloablative stem cell transplantation. *Blood.* 2007;109:4586-4588.
533. Mahindra A, Sobecks R, Rybicki L, et al. Elevated pretransplant serum ferritin is associated with inferior survival following nonmyeloablative allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2009.
534. Maradei SC, Maiolino A, de Azevedo AM, Colares M, Bouzas LF, Nucci M. Serum ferritin as risk factor for sinusoidal obstruction syndrome of the liver in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2009;114:1270-1275.
535. Storey JA, Connor RF, Lewis ZT, et al. The transplant iron score as a predictor of stem cell transplant survival. *J Hematol Oncol.* 2009;2:44.
536. Naka K, Muraguchi T, Hoshii T, Hirao A. Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10:1883-1894.
537. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* 2009;10:223-232.
538. Kantarjian HM, O'Brien S, Shan J, et al. Update of the decitabine experience in higher risk myelodysplastic syndrome and analysis of prognostic factors associated with outcome. *Cancer.* 2007;109:265-273.
539. Raza A, Galili N, Callander N, et al. Phase 1-2a multicenter dose-escalation study of ezatiostat hydrochloride liposomes for injection (Telintra(R), TLK199), a novel glutathione analog prodrug in patients with myelodysplastic syndrome. *J Hematol Oncol.* 2009;2:20.

ANNEXES

1. Annexe 1 : Human erythroleukemia : is the two-hit model of mouse leukemogenesis valid in the human disease ?

Séverine Coulon, Julie vandekerckhove, Michael Dussiot, Céline Callens, Felipe Suarez, Joëlle Kersual, Vahid Asnafi, Zakia Belaid, Geneviève Courtois, Stéphane Giraudier, Patrice Dubreuil, Yves Lepelletier, Ivan C. Moura, Olivier Hermine

Leukemia, 2007 Oct;21(10):2212-14

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. 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⁺, GPA⁺, C-Kit⁺, GP41⁺) 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⁺/IP⁺) dès 24 heures de traitement (données non publiées). Ainsi, la privation en fer semble être une approche thérapeutique attractive pour ce type de pathologies.

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).¹ 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.² 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.³ 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⁺, GPA⁺, c-Kit⁺, GP41⁻) 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

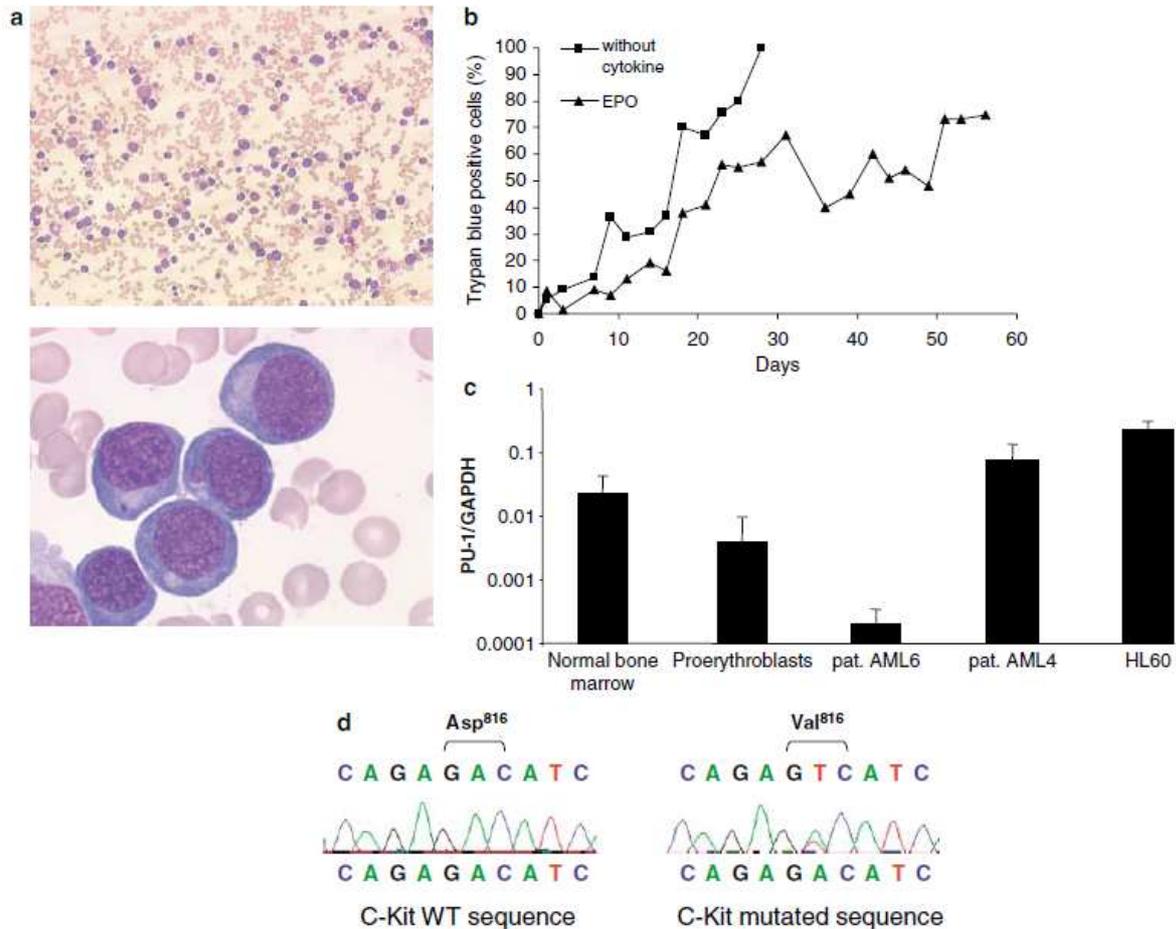


Figure 1 (a) Bone marrow aspirate smear containing undifferentiated cells having basophilic cytoplasm and round cell nucleus characteristic of proerythroblasts (May–Grunewald–Giemsa magnification $\times 400$ and $\times 1000$). (b) Cell proliferation curves of cultured proerythroblasts in the presence 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,⁴ 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.⁵ 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 AML⁶ 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 Coulon¹, J Vandekerckhove¹, M Dussiot¹, C Callens¹,
F Suarez², J Kersual¹, V Asnafi³, Z Belaid¹, G Courtois¹,
S Giraudier⁴, P Dubreuil⁵, Y Lepelletier¹, IC Moura^{1,6} and
O Hemine^{1,2}

¹CNRS UMR 8147, Université Paris V, Hôpital Necker, Paris,
France;

²Service d'hématologie, Hôpital Necker, Paris, France;

³Service d'hématologie biologique, Hôpital Necker, Paris,
France;

⁴Service d'hématologie biologique, Hôpital Henri Mondor,
Paris, France and

⁵Hématopoïèse moléculaire et fonctionnelle, U119 INSERM,
Marseille, France

E-mail: hermine@necker.fr

⁶Current 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.

2. Annexe 2 : Recent advances in adult T-cell leukemia therapy: focus on a new anti-transferrin receptor monoclonal antibody.

Céline Callens, Ivan C. Moura, Yves Lepelletier, Séverine Coulon, Amédée 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^{1,6}, IC Moura^{2,3}, Y Lepelletier¹, S Coulon¹, A Renand¹, M Dussiot¹, D Ghez⁴, M Benhamou^{2,3}, RC Monteiro^{2,3}, A Bazarbachi⁵ and O Hermine^{1,4}

¹CNRS UMR 8147, Université Paris 5, Faculté de Médecine Necker, Paris, France; ²INSERM U699, Paris, France; ³Université Paris 7, Faculté de Médecine Denis Diderot, Paris, France; ⁴Service d'Hématologie, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Paris, France and ⁵Department 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^{high}), 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).¹ 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.² 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.³ 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.⁴

ATLL exhibits diverse clinical features: the acute, the sub-acute or smoldering, the chronic forms and the ATL lymphoma.⁵ 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.⁶ 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⁺ 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.⁷ 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.^{8,9}

ATLL diagnosis is generally made on morphological analysis (histological or cytological infiltration by flower cells) and on immunophenotype.⁶ No specific chromosomal abnormalities have been associated with ATLL, but the cytogenetic analysis of leukemic cells usually shows multiple nonspecific abnormalities.¹⁰ 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).¹¹

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.⁶

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

⁶C 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

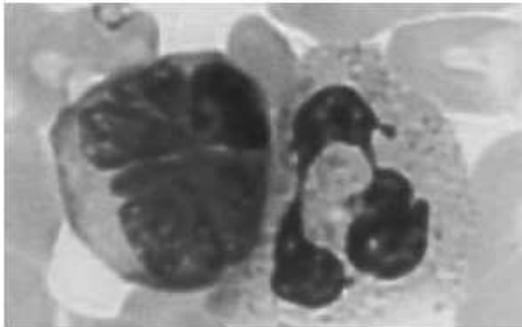


Figure 1 May Grünwald Giemsa staining of a flower cell near a polymorphonuclear neutrophil found in the peripheral blood of an ATLL patient.

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- κ B pathway (constitutively activated in ATLL cells) such as arsenic and proteasome inhibitors showed their efficacy *in vitro* alone or in combination with interferon- α and chemotherapy, respectively. They are currently tested in clinical trials. All these aspects have been extensively reviewed recently.¹² 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 α receptor (CD25, also called the Tac antigen). However, in clinical trials anti-CD25 antibody was not effective against acute forms of ATLL.¹³ Furthermore, radio-immunotherapy using yttrium labeling of the anti-CD25 resulted only in a small improvement of response rates.¹⁴

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-1 infected cells.¹⁵ mAbs against CD2 have shown efficient activities in ATLL mice,¹⁶ and antibodies to IL-15 or to its receptor inhibited the proliferation of peripheral blood mononuclear cells from patients with HTLV-1-associated myelopathy,¹⁵ 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.¹⁷ 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.¹⁸ 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.¹⁹ 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.²⁰ Transferrin is the main protein involved in serum iron transport and iron uptake is essentially dependent on receptor-mediated endocytosis, involving the transferrin receptor.²¹

TfR-1 is a type II transmembrane glycoprotein largely expressed on proliferating cells.²² This homodimeric receptor (180 kDa) allows internalization of iron-bound transferrin in clathrin-coated pits.^{23,24} 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).²⁵

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.²⁶ 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.^{27,28} 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.^{29,30} In leukemia, lymphoma and myeloma, TfR-1 is expressed at higher level on circulating cancer cells.³¹

Recently, a new TfR, TfR-2, was cloned.^{32,33} 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.^{32,34} Nevertheless, TfR2 protein levels seem to be correlated positively with Tf saturation.³⁵ By contrast with TfR-1, TfR-2 expression is very restricted and was first described on hepatocytes and enterocytes of the small intestine only.³⁶ 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.³⁷ 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.³⁸ 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.

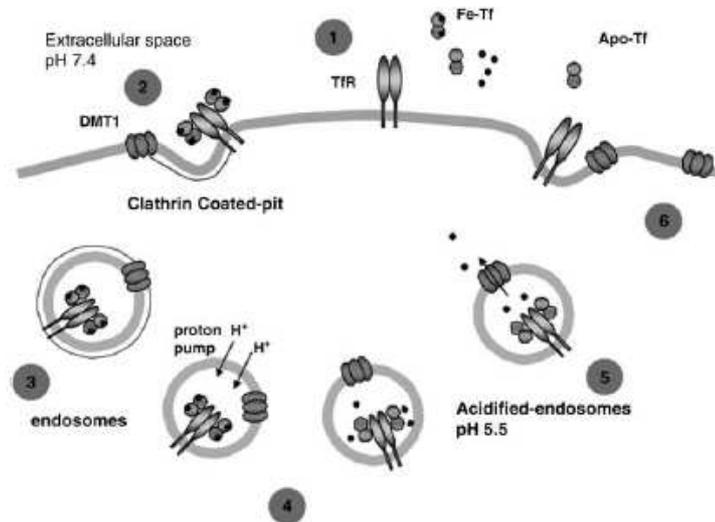


Figure 2 Endocytosis of TFR-1 induced by Fe-Tf. At physiological pH, membrane TFR-1 binds to Fe-loaded (holo)-transferrin (1). Endocytosis starts through clathrin-coated pits (2) that invaginate and give rise to vesicles containing ligand-receptor complexes (3). Following endosomal acidification (pH 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.^{39,40} 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.⁴¹ 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.⁴² 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.⁴³ 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.^{44,45} 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.⁴⁶ 42/6 was tested on normal T cells, lymphoid and myeloid leukemia cell lines. It blocks cell proliferation in a manner reversible 48h after its removal from the culture medium.⁴⁵ 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.⁴⁷ 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.⁴⁸ 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.⁴⁹ An anti-human transferrin receptor IgG3-avidin fusion protein was reported to inhibit the proliferation of malignant cells dependent of antibody cross-linking.⁵⁰ 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.⁵¹

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)⁵²

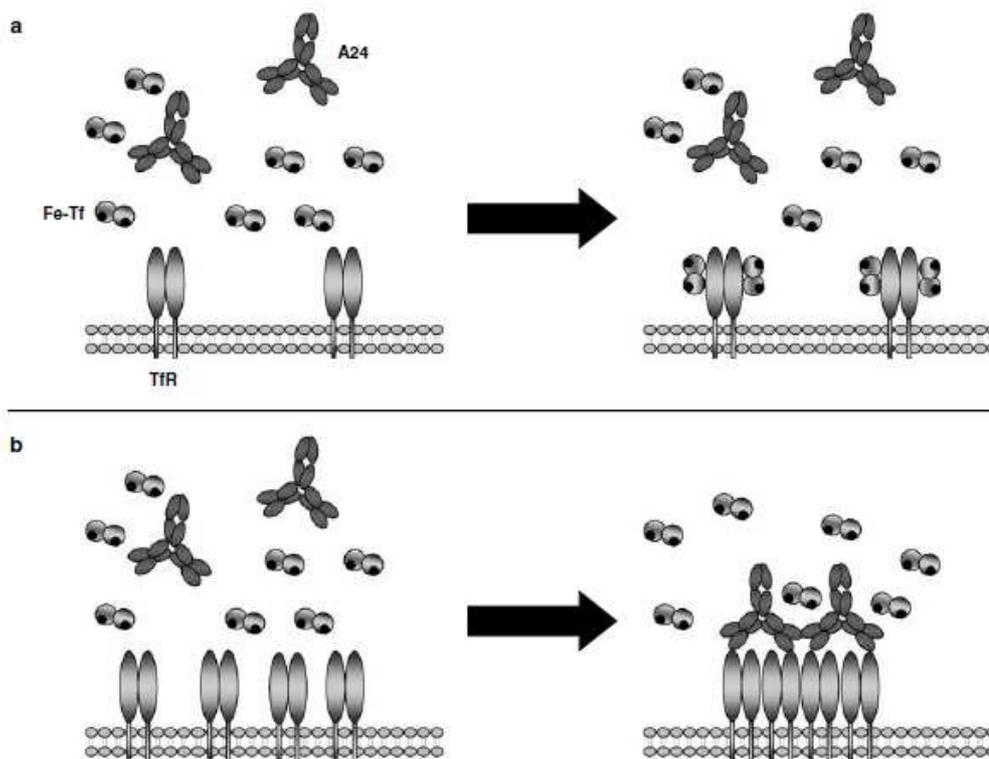


Figure 3 A24 competes with Fe-Tf for receptor binding. Surface plasmon resonance experiments were performed to determine the binding properties of A24 and Fe-Tf to the TIR-1 ectodomain. The affinity of A24 for a low-density surface of TIR-1 was three times lower than that of Fe-Tf. Thus, in cells expressing 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.¹⁹ 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 ⁵⁵Fe-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 α -mAb (daclizumab) and inhibited the emergence of HTLV-I-infected T-cell clones. The association of IFN- α , 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 A24.¹⁹

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

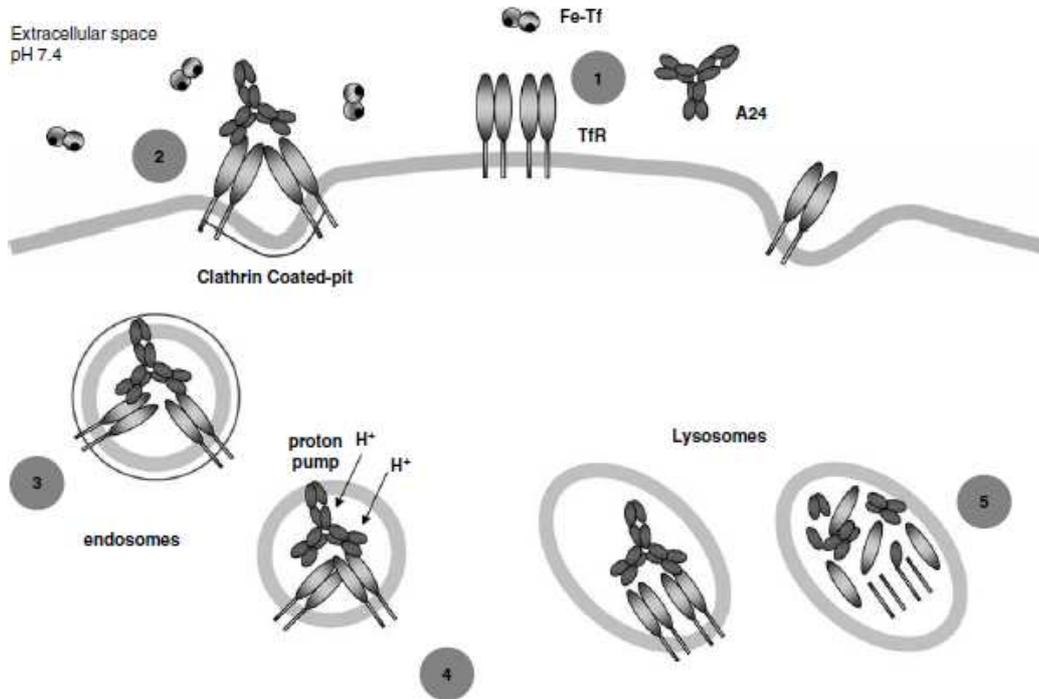


Figure 4 Endocytosis of TIR-1 induced by A24. In cell membranes containing high density of TIR-1, like in tumor cells, A24 binds to TIR-1 (1). A24/TIR-1 complexes are endocytosed through the classical clathrin-coated AP-2-dependant pathway (2–3). Endosomes are acidified (4) and TIR-1/A24 complexes instead 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.⁵³

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-1 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 α 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 TIR. We have recently reported a new anti-TIR-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, Cout O, Maurs L, Calender A *et al*. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I 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

- frozen-thawed milk from human T-lymphotropic virus type-1 positive mothers. *J Obstet Gynaecol Res* 2004; **30**: 436-438.
- 5 Shimoyama M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br J Haematol* 1991; **79**: 428-437.
 - 6 Takatsuki K. Adult T-cell leukemia/lymphoma. In: Gallo RC, Wong-Staal F (eds). *Retrovirus Biology and Human Disease*. Marcel Dekker: New York, 1990, pp 147-159.
 - 7 Okayama A, Stuver S, Matsuoka M, Ishizaki J, Tanaka G, Kubuki Y et al. Role of HTLV-1 proviral DNA load and clonality in the development of adult T-cell leukemia/lymphoma in asymptomatic carriers. *Int J Cancer* 2004; **110**: 621-625.
 - 8 Franchini G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 infection. *Blood* 1995; **86**: 3619-3639.
 - 9 Yoshida M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**: 475-496.
 - 10 Manuyama K, Fukushima T, Kawamura K, Mochizuki S. Chromosome and gene rearrangements in immortalized human lymphocytes infected with human T-lymphotropic virus type I. *Cancer Res* 1990; **50** (17 Suppl): 5697S-5702S.
 - 11 Tsukasaki K, Tsushima H, Yamamura M, Hata T, Murata K, Maeda T et al. Integration patterns of HTLV-1 provirus in relation to the clinical course of ATL: frequent clonal change at crisis from indolent disease. *Blood* 1997; **89**: 948-956.
 - 12 Bazarbachi A, Ghez D, Lepelletier Y, Nasr R, de The H, El-Sabban ME et al. New therapeutic approaches for adult T-cell leukaemia. *Lancet Oncol* 2004; **5**: 664-672.
 - 13 Waldmann TA, Goldman CK, Bongiovanni KF, Sharrow SO, Davey MP, Cease KB et al. Therapy of patients with human T-cell lymphotropic virus I-induced adult T-cell leukemia with anti-Tac, a monoclonal antibody to the receptor for interleukin-2. *Blood* 1988; **72**: 1805-1816.
 - 14 Waldmann TA, White JD, Carrasquillo JA, Reynolds JC, Paik CH, Gansow OA et al. Radioimmunotherapy of interleukin-2R alpha-expressing adult T-cell leukemia with Yttrium-90-labeled anti-Tac. *Blood* 1995; **86**: 4063-4075.
 - 15 Azimi N, Jacobson S, Leist T, Waldmann TA. Involvement of IL-15 in the pathogenesis of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: implications for therapy with a monoclonal antibody directed to the IL-2/15R beta receptor. *J Immunol* 1999; **163**: 4064-4072.
 - 16 Zhang Z, Zhang M, Ravetch JV, Goldman C, Waldmann TA. Effective therapy for a murine model of adult T-cell leukemia with the humanized anti-CD2 monoclonal antibody, MEDI-507. *Blood* 2003; **102**: 284-288.
 - 17 Zhang Z, Zhang M, Goldman CK, Ravetch JV, Waldmann TA. Effective therapy for a murine model of adult T-cell leukemia with the humanized anti-CD52 monoclonal antibody, Campath-1H. *Cancer Res* 2003; **63**: 6453-6457.
 - 18 Taylor GP, Matsuoka M. Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. *Oncogene* 2005; **24**: 6047-6057.
 - 19 Moura IC, Lepelletier Y, Arnulf B, England P, Baude C, Beaumont C et al. A neutralizing monoclonal antibody (mAb A24) directed against the transferrin receptor induces apoptosis of tumor T lymphocytes from ATL patients. *Blood* 2004; **103**: 1838-1845.
 - 20 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.
 - 21 Ponka P, Lok CN. The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; **31**: 1111-1137.
 - 22 Neckers LM, Trepel JB. Transferrin receptor expression and the control of cell growth. *Cancer Invest* 1986; **4**: 461-470.
 - 23 Klausner RD, Ashwell G, van Renswoude J, Harford JB, Bridges KR. Binding of apotransferrin to K562 cells: explanation of the transferrin cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 2263-2266.
 - 24 van Renswoude J, Bridges KR, Harford JB, Klausner RD. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and the uptake of Fe in K562 cells: identification of a nonlysosomal acidic compartment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 6186-6190.
 - 25 Pantopoulos K. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann NY Acad Sci* 2004; **1012**: 1-13.
 - 26 Gatter KC, Brown G, Trowbridge IS, Woolston RE, Mason DY. Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. *J Clin Pathol* 1983; **36**: 539-545.
 - 27 Faulk WP, Hsi BL, Stevens PJ. Transferrin and transferrin receptors in carcinoma of the breast. *Lancet* 1980; **2**: 390-392.
 - 28 Habeshaw JA, Lister TA, Stansfeld AG, Greaves MF. Correlation of transferrin receptor expression with histological class and outcome in non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 1983; **1**: 498-501.
 - 29 Sieff C, Bicknell D, Caine G, Robinson J, Lam G, Greaves MF. Changes in cell surface antigen expression during hemopoietic differentiation. *Blood* 1982; **60**: 703-713.
 - 30 Taetle R. The role of transferrin receptors in hemopoietic cell growth. *Exp Hematol* 1990; **18**: 360-365.
 - 31 Yeh CJ, Taylor CG, Faulk WP. Transferrin binding by peripheral blood mononuclear cells in human lymphomas, myelomas and leukemias. *Vox Sang* 1984; **46**: 217-223.
 - 32 Kawabata H, Germain RS, Vuong PT, Nakamaki T, Said JW, Koeffler HP. Transferrin receptor 2-alpha supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and *in vivo*. *J Biol Chem* 2000; **275**: 16618-16625.
 - 33 Trinder D, Baker E. Transferrin receptor 2: a new molecule in iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; **35**: 292-296.
 - 34 Kawabata H, Nakamaki T, Ikonomi P, Smith RD, Germain RS, Koeffler HP. Expression of transferrin receptor 2 in normal and neoplastic hematopoietic cells. *Blood* 2001; **98**: 2714-2719.
 - 35 Robb A, Wessling-Resnick M. Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. *Blood* 2004; **104**: 4294-4299.
 - 36 Deaglio S, Capobianco A, Cali A, Bellora F, Alberti F, Righi L et al. Structural, functional, and tissue distribution analysis of human transferrin receptor-2 by murine monoclonal antibodies and a polyclonal antiserum. *Blood* 2002; **100**: 3782-3789.
 - 37 Calzolari A, Deaglio S, Sposi NM, Petrucci E, Morsilli O, Gabbianelli M et al. Transferrin receptor 2 protein is not expressed in normal erythroid cells. *Biochem J* 2004; **381** (Part 3): 629-634.
 - 38 Calzolari A, Oliviero I, Deaglio S, Mariani G, Biffoni M, Sposi NM et al. Transferrin receptor 2 is frequently expressed in human cancer cell lines. *Blood Cells Mol Dis* 2007; **39**: 82-91.
 - 39 Trowbridge IS, Lesley J, Schulte R. Murine cell surface transferrin receptor: studies with an anti-receptor monoclonal antibody. *J Cell Physiol* 1982; **112**: 403-410.
 - 40 Trowbridge IS, Collawn J, Jing S, White S, Esekogwu V, Stangel M. Structure-function analysis of the human transferrin receptor: effects of anti-receptor monoclonal antibodies on tumor growth. *Curr Stud Hematol Blood Transfus* 1991; **58**: 139-147.
 - 41 Lesley JF, Schulte RJ. Inhibition of cell growth by monoclonal anti-transferrin receptor antibodies. *Mol Cell Biol* 1985; **5**: 1814-1821.
 - 42 Kemp JD, Cardillo T, Stewart BC, Kehrberg E, Weiner G, Hedlund B et al. Inhibition of lymphoma growth *in vivo* by combined treatment with hydroxyethyl starch deferoxamine conjugate and IgG monoclonal antibodies against the transferrin receptor. *Cancer Res* 1995; **55**: 3817-3824.
 - 43 Taetle R, Honeysett JM, Trowbridge I. Effects of anti-transferrin receptor antibodies on growth of normal and malignant myeloid cells. *Int J Cancer* 1983; **32**: 343-349.
 - 44 Petri M, Pelosi-Testa E, Sposi NM, Mastroberardino G, Camagna A, Bottero L et al. Constitutive expression and abnormal glycosylation of transferrin receptor in acute T-cell leukemia. *Cancer Res* 1989; **49** (24 Part 1): 6989-6996.
 - 45 Trowbridge IS, Omary MB. Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 3039-3043.
 - 46 Taetle R, Castagnola J, Mendelsohn J. Mechanisms of growth inhibition by anti-transferrin receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1986; **46** (4 Part 1): 1759-1763.
 - 47 Brooks D, Taylor C, Dos Santos B, Linden H, Houghton A, Hecht TT et al. Phase Ia trial of murine immunoglobulin A antitransferrin receptor antibody 42/6. *Clin Cancer Res* 1995; **1**: 1259-1265.
 - 48 Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB, Dewitz MC. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol* 2005; **23**: 1073-1078.
 - 49 Qing Y, Shuo W, Zhihua W, Huijen Z, Ping L, Lijiang L et al. The *in vitro* antitumor effect and *in vivo* tumor-specificity distribution of human-mouse chimeric antibody against transferrin receptor. *Cancer Immunol Immunother* 2006; **55**: 1111-1121.

- 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.

3. Annexe 3 : Polymeric IgA1 controls erythroblast proliferation and accelerates erythropoiesis recovery in anemia

Séverine Coulon, Pamela Huey Mei Wang, Damien Grapton, Céline Callens, Michael Dussiot, Julie Vandekerckhove, Houda Tamouza, Meetu Tiwari, Yael Zermati, Jean-Antoine Ribeil, Kamel Djedaini, Geneviève Courtois, Bertrand Arnulf, Marie-Alexandra Alyanakian, Patrick Mayeux, Catherine Lacombe, Marc Benhamou, Michel Cogné, Renato C. Monteiro, Olivier Hermine, Ivan C. Moura

Article en revision après soumission à Nature Medicine

Contexte du travail :

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).

Résultats :

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 hématocrite. 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.

Perspectives :

Ce travail montre la régulation positive de l'érythropoïèse par les igA polymériques (pIgA1) de manière physiologique dans les érythroblastes. Il reste à déterminer 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 ou les cellules dendritiques. Le RTf1 pourrait également jouer un rôle oncogénique au delà de son rôle pour l'entrée du fer dans les cellules tumorales. 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 médullaire (myélodysplasie, myélofibrose...).

Cette étude a fait l'objet du travail de thèse de M^{elle} Séverine Coulon.

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

Séverine Coulon¹, Pamella Huey Mei Wang^{2,3}, Damien Grapton^{1,2,3}, Celine Callens¹, Michaël Dussiot¹, Julie Vandekerckhove¹, Houda Tamouza^{2,3}, Meetu Tiwari^{2,3}, Yael Zermati¹, Jean-Antoine Ribeil¹, Kamel Djedaini⁴, Geneviève Courtois¹, Bertrand Arnulf^{5,6}, Marie Alexandra Alyanakian^{7,8}, Patrick Mayeux^{9,10,11}, Catherine Lacombe^{9,10,11}, Marc Benhamou^{2,3}, Michel Cogné¹², Renato C. Monteiro^{2,3}, Olivier Hermine^{1,13} and Ivan C. Moura^{2,3}

¹CNRS UMR 8147, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Hôpital Necker, Paris, France

²INSERM, U699, Paris, France

³Faculté de Médecine and Université Denis Diderot Paris VII, Paris, France

⁴Clinique Geoffroy Saint-Hilaire, Paris, France

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

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

⁷INSERM, U580, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Hôpital Necker, Paris, France

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

⁹Institut Cochin, Département d'Hématologie, Paris, France

¹⁰INSERM, U567, Paris, France

¹¹UMR-S 8104, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Paris, France

¹²Université de Limoges; CNRS UMR 6101, France

¹³Service 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, 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 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.

Anemia is a major complication in patients suffering from Chronic Kidney Disease (CKD) and Cancer ^{1,2}. Erythropoietin (Epo) is the main cytokine controlling terminal erythropoiesis ³ and its administration usually restores hematocrit and hemoglobin levels in anemic patients ⁴. 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 ⁵. 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.

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^{6,7}. Epo is crucial to the end stage of erythropoiesis allowing terminal differentiation³, which is dependent on caspase-3 activation⁸. 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 cleavage⁹.

Another feature of erythroid precursors is their absolute requirement for iron to support hemoglobin production. Transferrin receptor 1 (CD71/TfR1) is essential for erythropoiesis¹⁰ 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 functions¹¹⁻¹³. We recently identified TfR1 as a type A1 immunoglobulin (IgA1) receptor⁵. 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)^{5,14,15}.

Given that IgA1⁺ plasma cells are abundant in the BM¹⁶, where erythropoiesis takes place, and that TfR1 is a receptor highly expressed on erythroblasts¹⁷, we hypothesized that IgA1 could play a role in erythropoiesis. On human BM aspirates, polymeric (p) IgA1 bound to TfR1^{high} erythroid glycoporphin A⁺ (GPA) cells (Supplemental Figures 1A and 1B) but not GPA⁺ TfR1^{low} cells (Supplemental Figure 1B). As expected pIgA1 bound CD11b⁺ cells, which express CD89 (Supplemental Figure 1A)¹⁸. pIgA1 binding was also observed in cord blood-derived erythroid cells (CD36⁺ 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)^{19,20}, prevented plgA1 binding (Supplemental Figure 2E). Therefore, plgA1 binds erythroid cells through TfR1.

To examine the role of plgA1 in erythropoiesis, human CD34⁺ 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 plgA1 or IgG (as a control). As expected, in the absence of growth factors, plgA1 did not support the growth of erythroblasts (data not shown). At a saturating concentration of growth factors, no difference in the presence of plgA1 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)¹⁹ 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⁺/Tfr1⁺ but not TER-119⁺/Tfr1⁻ murine erythroblasts (Supplemental Figure 7A). For this purpose we used two mouse models : *i*- human (h) IgA1 knock-in (α 1KI) mice constitutively producing hIgA1 or *ii*- passive transfer through intravenous injection of hIgA1 in immunodeficient mice. α 1KI mice carry a homozygous mutation of the IgH heavy chain locus, obtained through replacement of the mouse switch μ region (S μ) by the human C α 1 gene. In these mice, hIgA1 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 spleen²¹. α 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 α 1KI mice, the presence of hIgA1 accelerated the erythropoietic recovery from anemia (Figure 2A), enhanced spleen TER-119⁺/Tfr1⁺ 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⁺/TfR1⁺ 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⁺/TfR1⁺ 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 humans²² 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⁺ 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 plgA1/mlgA1 ratio was increased (Figure 4C).

The Epo level is tightly regulated by tissue oxygenation through the hypoxia-inducible factor (HIF) transcriptional complex²³. 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 plgA1, we compared the level of plgA1 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 plgA1 (Figures 4D and E) suggesting that the plgA1 level can be modulated by the oxygen level.

We demonstrate that plgA1 can prime erythroblasts for survival and proliferation under suboptimal concentrations of either Epo or SCF. We propose that plgA1 is a positive regulator of erythropoiesis that modulates the sensitivity of progenitors to growth factors. Moreover, the plgA1 level is increased by hypoxia, whereas the Epo level is increased in IgA-deficient patients, suggesting compensatory mechanisms indicative of plgA1 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 expression¹¹. 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 plgA1). 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 plgA1 sheds light on the molecular mechanisms underlying the heterogeneous sensitivity of erythroblast progenitors to Epo and SCF²⁴. 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).

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 κ)⁵ and anti-IgA (Southern Biotech) mAbs were used. Human myeloma-derived IgA1 (Dou, Oli and Prud) were purified as previously described⁵. 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

α 1KI mice were generated as described (Cogné et al manuscript under revision). Briefly, a human genome 6kb fragment containing the α 1 gene was flanked with 5' and 3' arms (from murin S μ and C μ 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. $\alpha 1KINeo/\alpha 1KINeo$ mice were further mated with Ella-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 scholesing, USA). Reticulocyte counts were performed on blood smears stained with brilliant cresyl blue (Merck, Darmstadt, Germany).

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

CD34⁺ 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⁺ 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 described²⁵. In some cases, CD36⁺ cells were cultured with cytokines as described above in IMDM supplemented with insulin (7.5 μ g/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 cells²⁶ were maintained in α -minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Hyclone) and Epo (2 U/ml) at 37°C in a 5% CO₂, 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 5 μ M Fe-NTA .

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% CO₂ 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.

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 (***).

Acknowledgments

This work is supported by Agence nationale pour la recherche (ANR), l'institut national contre le cancer (INCA), Cancéropôle d'Île de France, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), the Fondation de France, the Association Laurette Fugain, the Association pour la recherche contre le cancer (ARC) and the Inserm/PNRNU2007 grants. S.C. is a recipient of FRM grant. The authors would like to thank Joel Kersual and Sophie Dauzet for experimental help, the hematology and obstetric units (Necker Hospital, Paris, France) for providing us with blood samples.

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).

Figure Legends

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 (2×10^6 cells/condition) were starved of growth factors for 18 hours and incubated with SCF (0.5ng/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 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$). 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 $\alpha 1\text{KI}$ mice ($n=3$) and littermate controls ($n=5$). Hematocrit level of $\alpha 1\text{KI}$ 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 ($\alpha 1\text{KI}$ 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 μg 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: Erythroblast growth is impaired in the absence of IgA and Epo levels are enhanced in IgA-D patients.

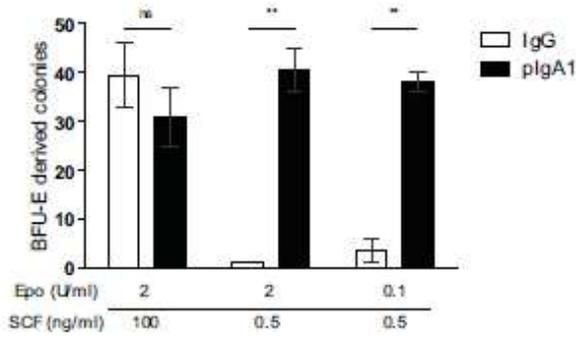
In vitro cultures of erythroid precursors were performed in the presence of serum from IgA-deficient patients, which was supplemented with pIgA1 or IgG, and healthy subjects. CD36⁺ erythroid progenitors were purified and cultured in the presence of 5% human serum (instead of serum-free medium) supplemented 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

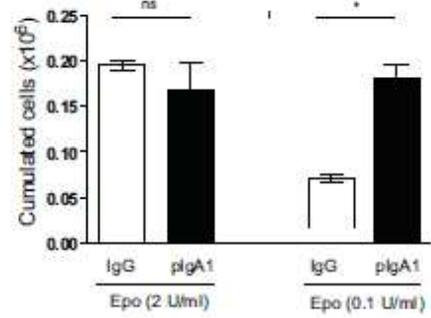
(A) Five-hundred microliters of serum (gray line) or supernatant of BM aspirates (black line) from healthy volunteers was fractionated by gel filtration. The fractions were analyzed for

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 \pm 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 \pm SEM ($n=4$). * $p < 0.05$.

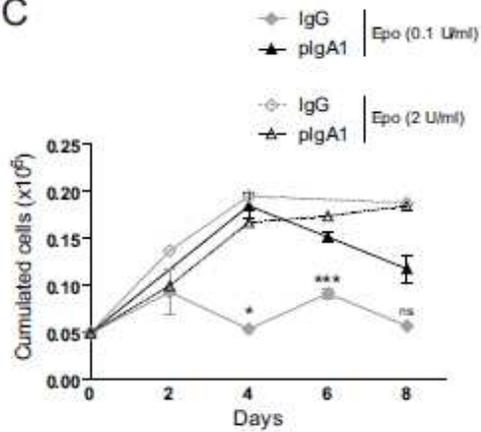
A



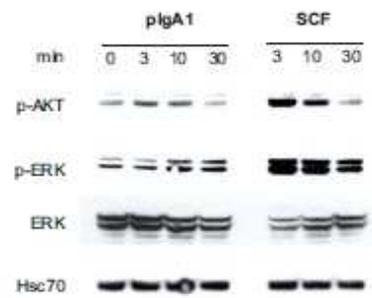
B



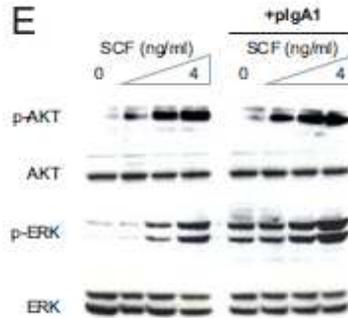
C



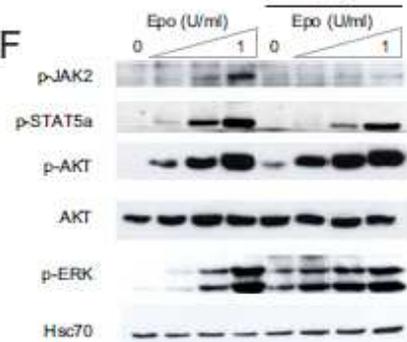
D



E



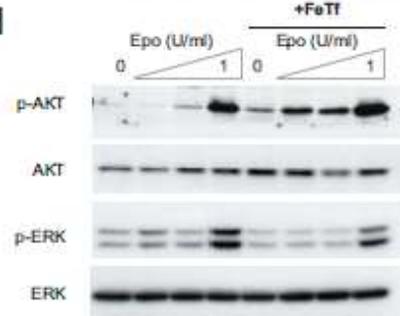
F

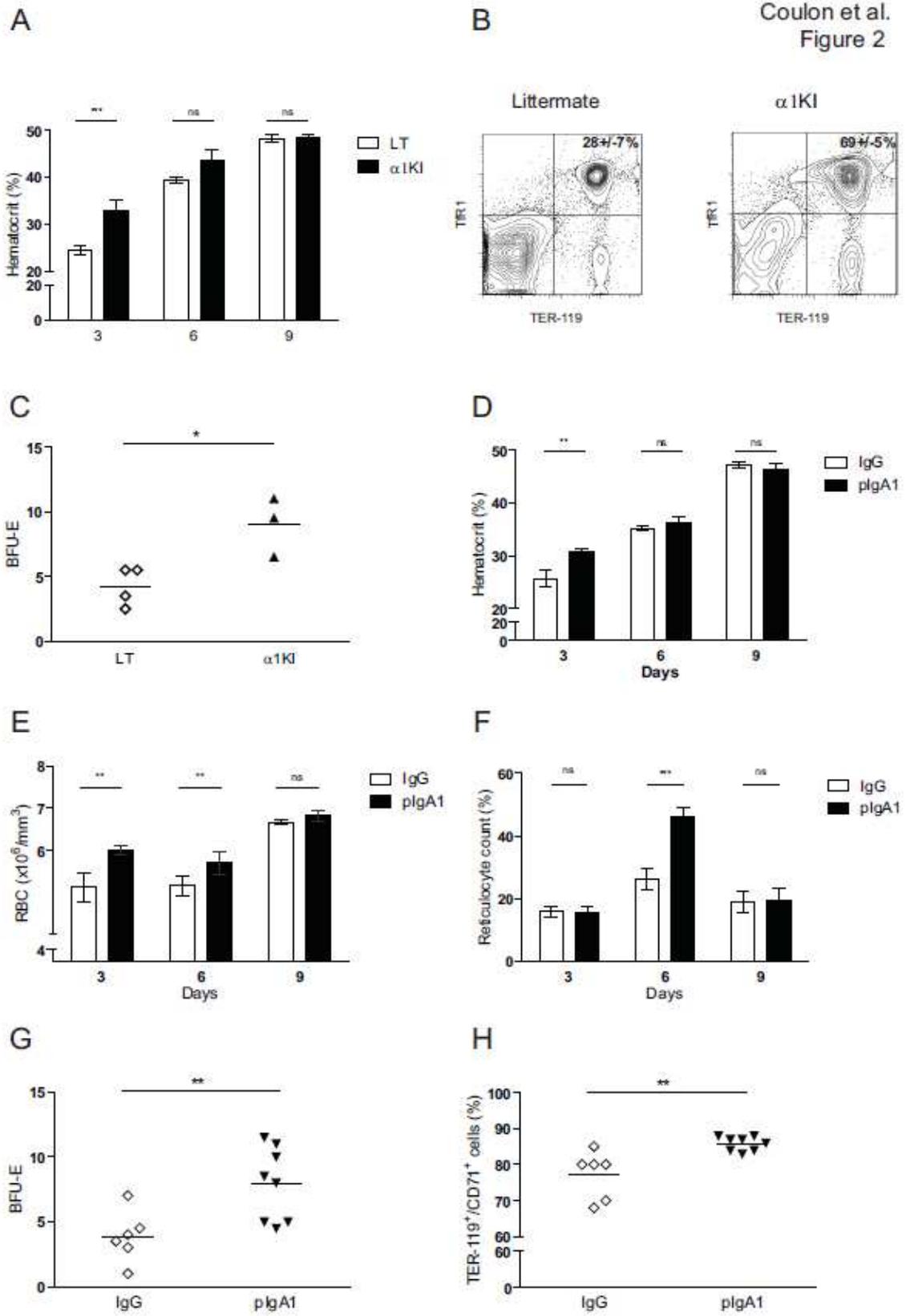


G

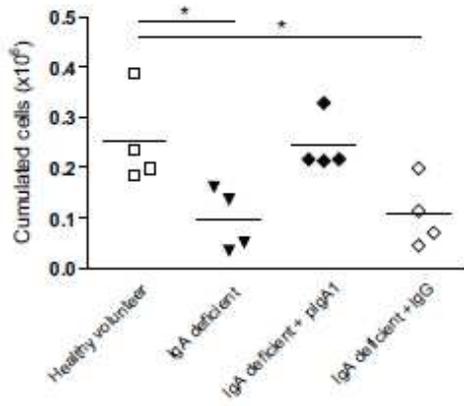


H

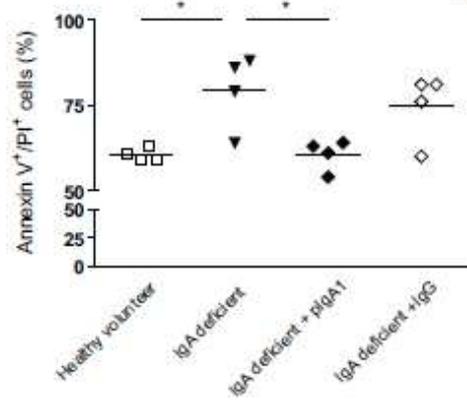




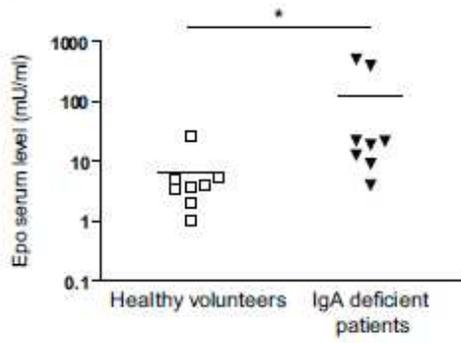
A

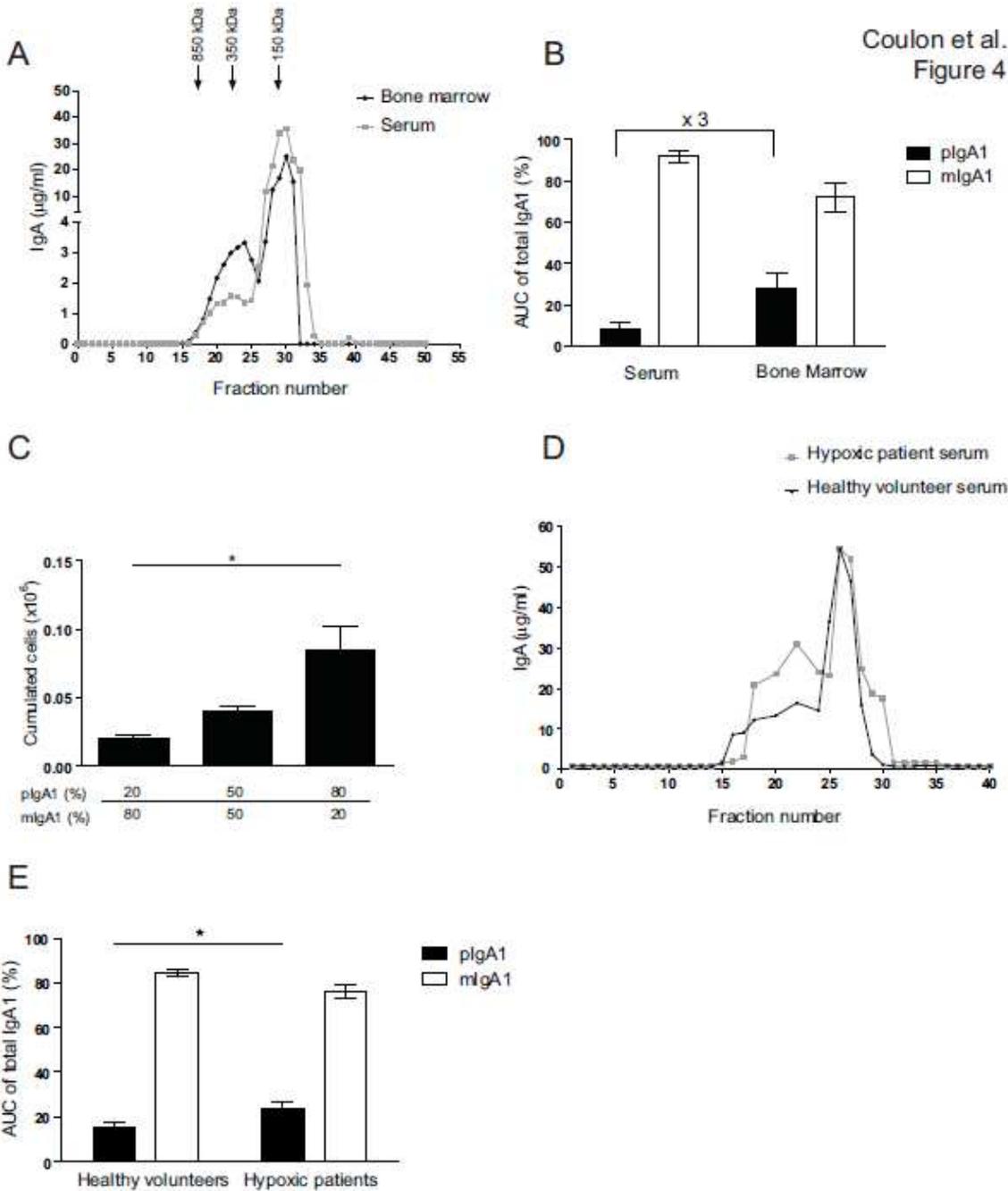


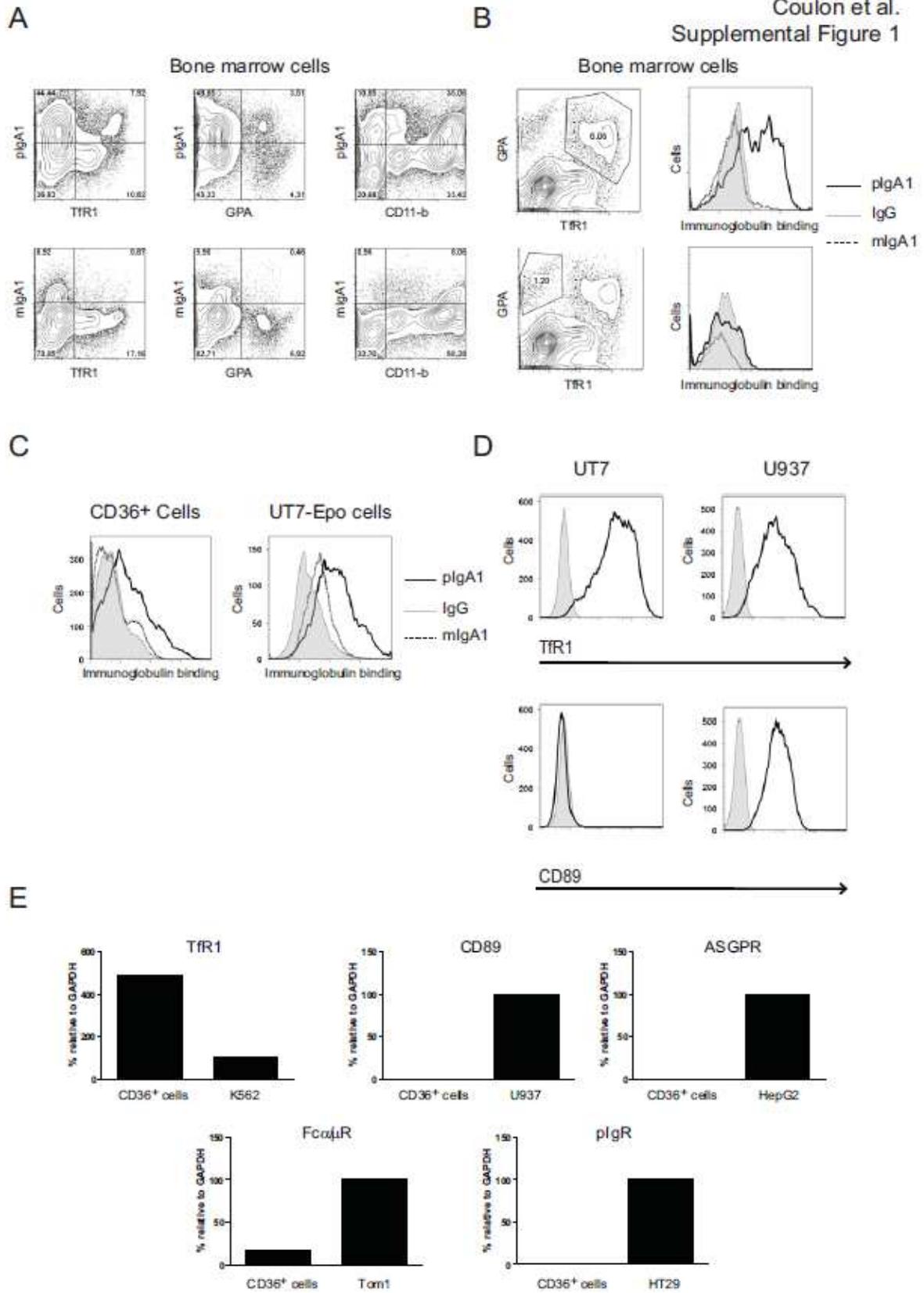
B



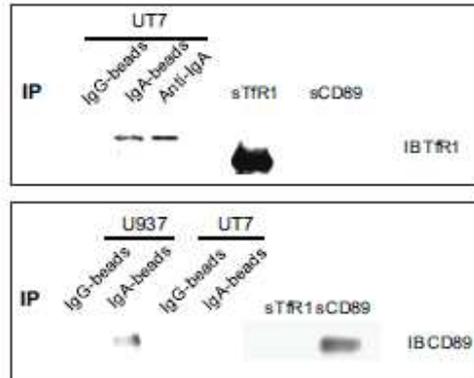
C



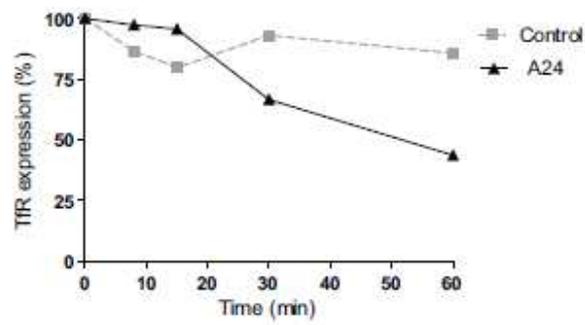




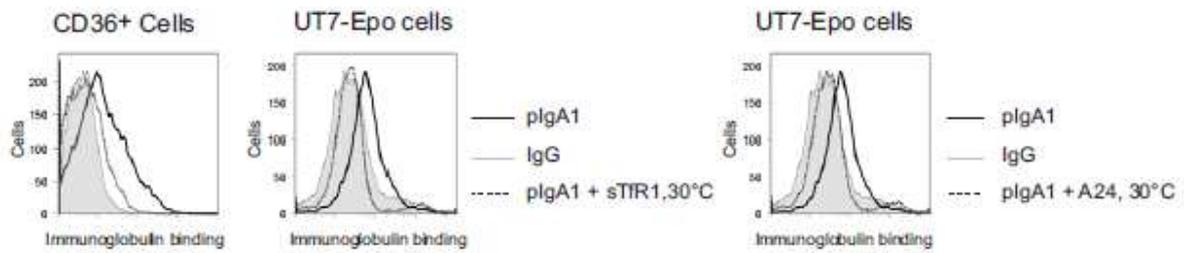
A

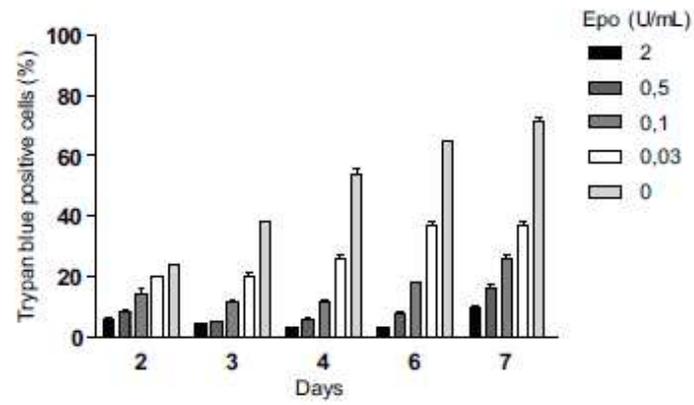


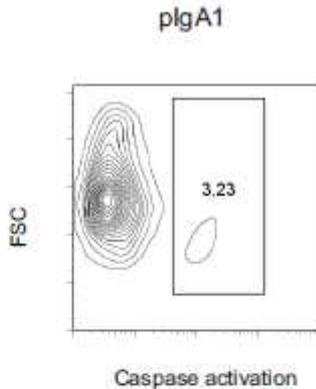
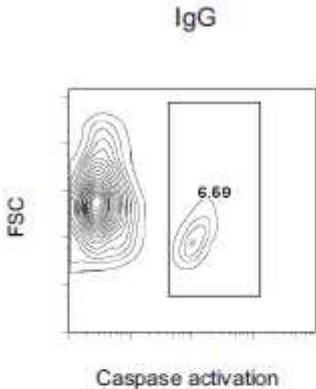
B

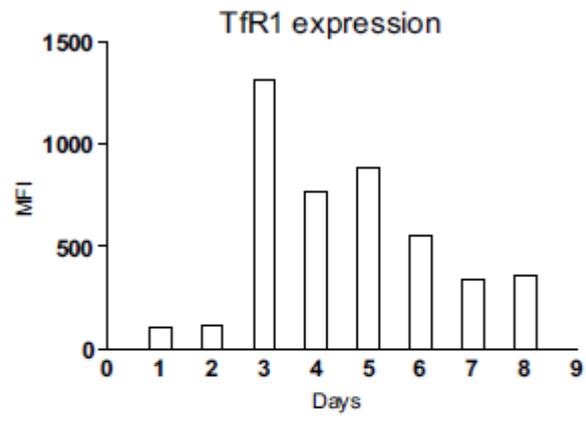


C

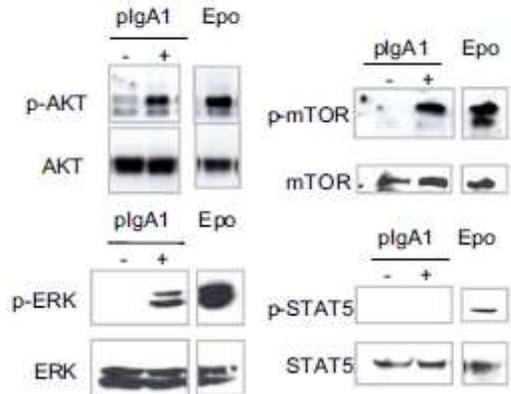




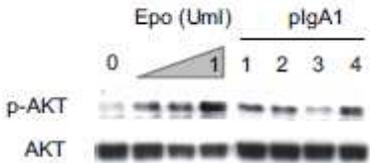




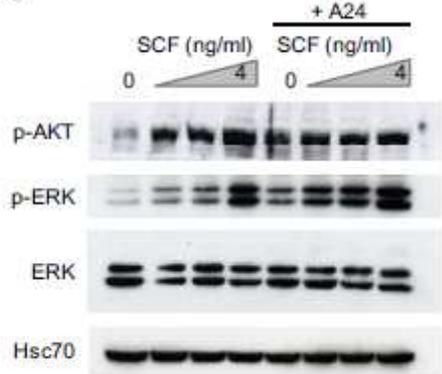
A



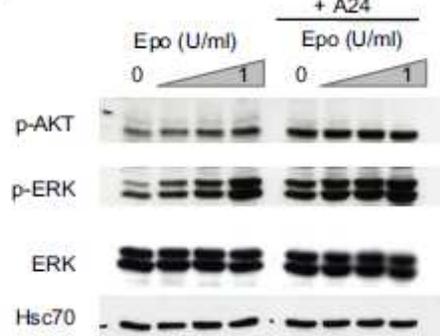
B



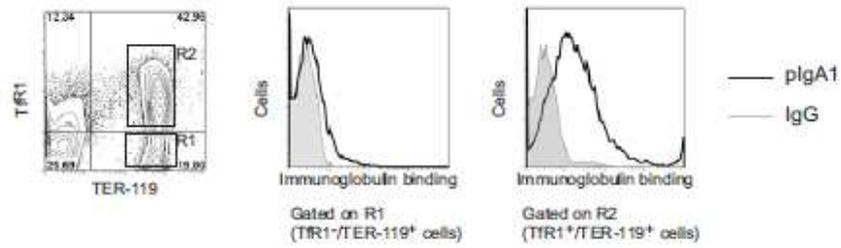
C



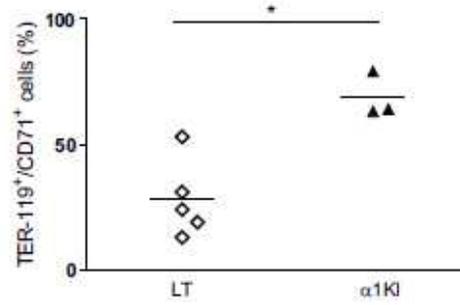
D



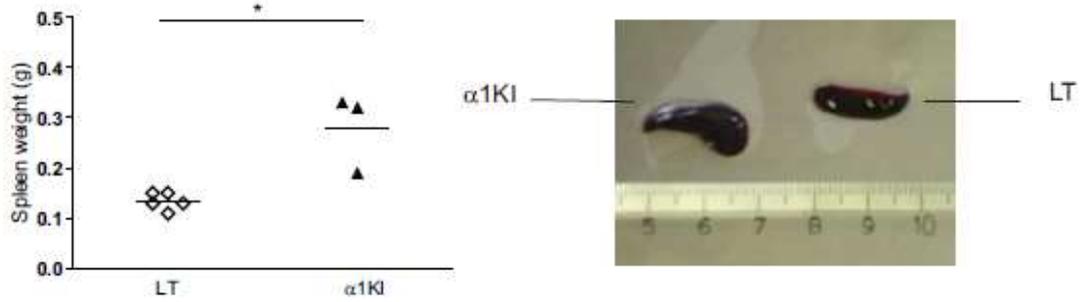
A

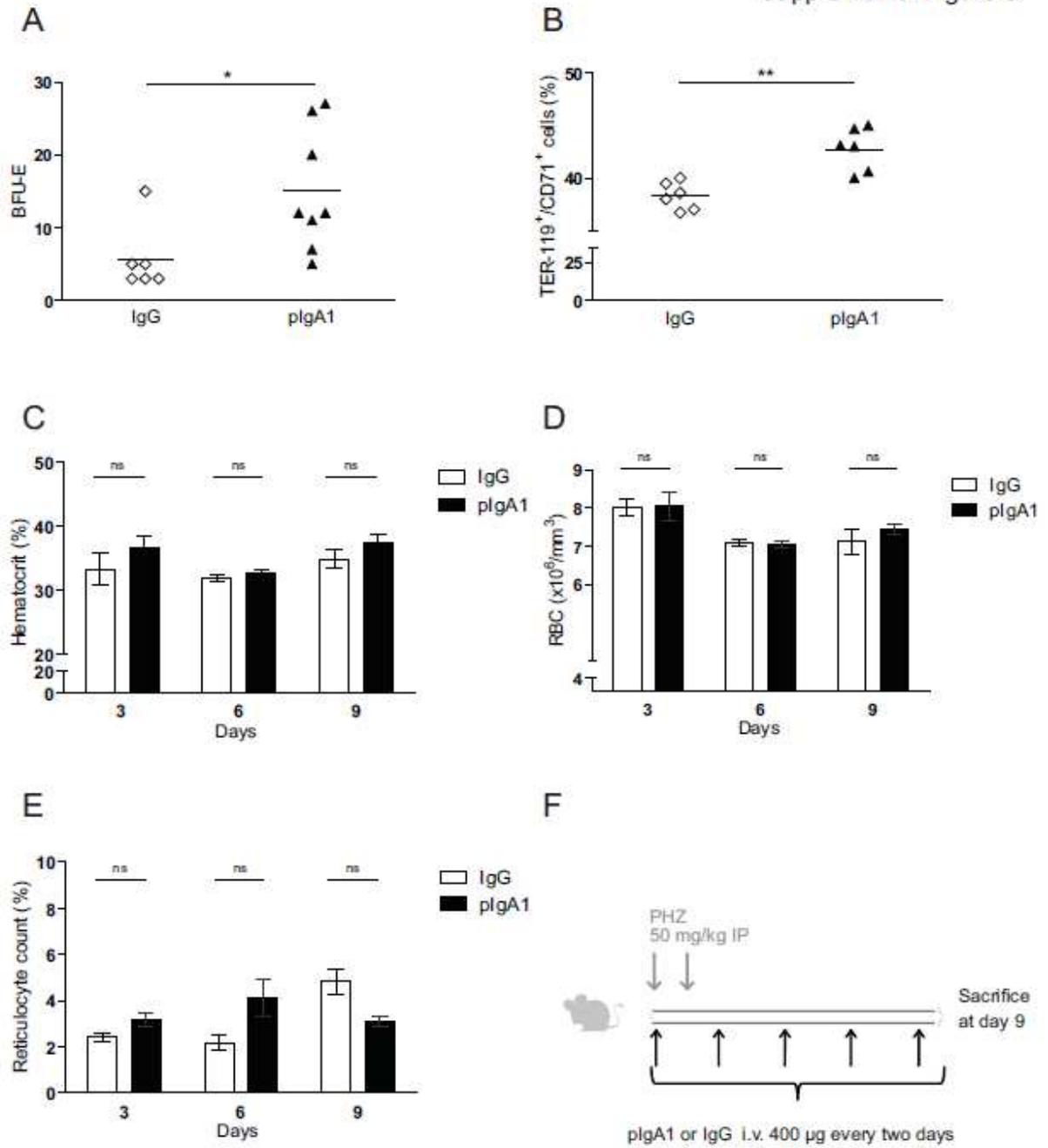


B

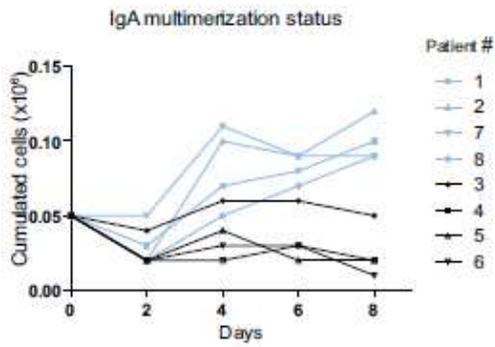


C

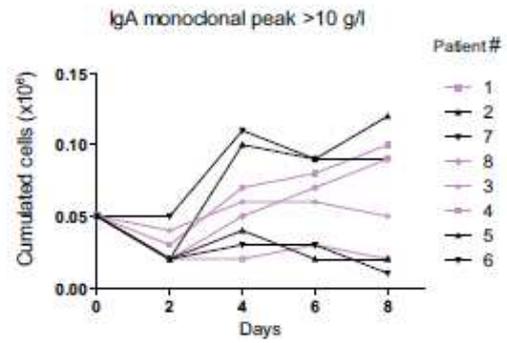




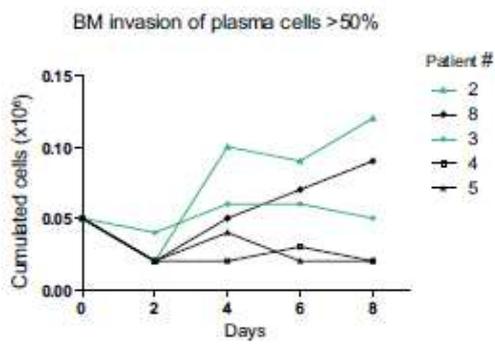
A



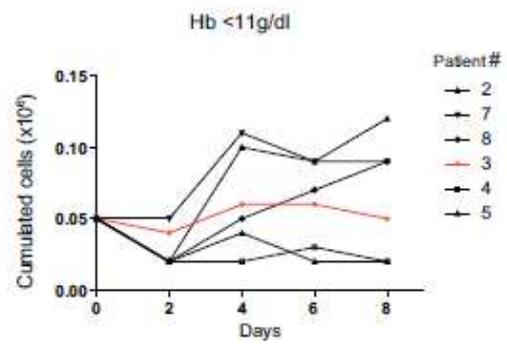
B

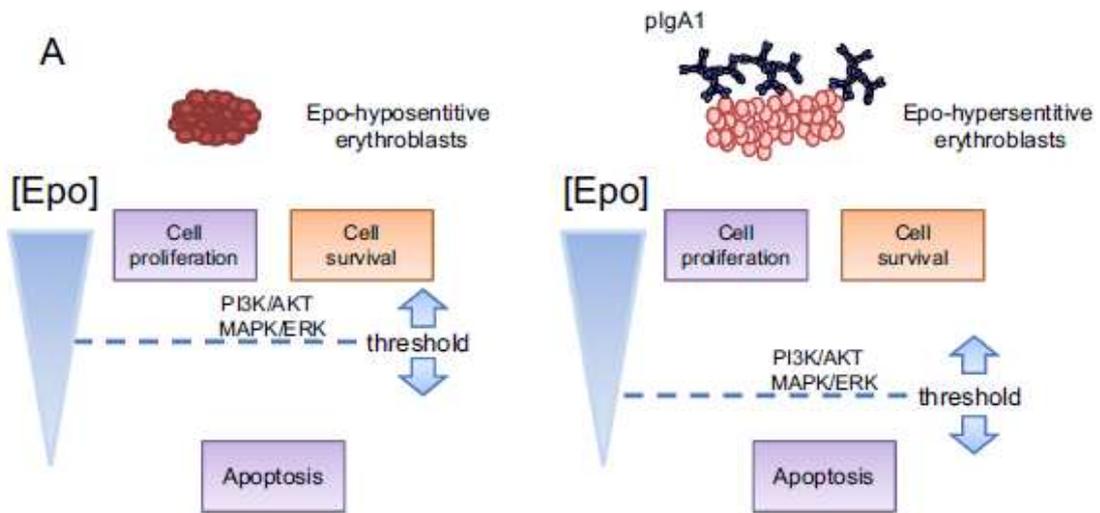


C

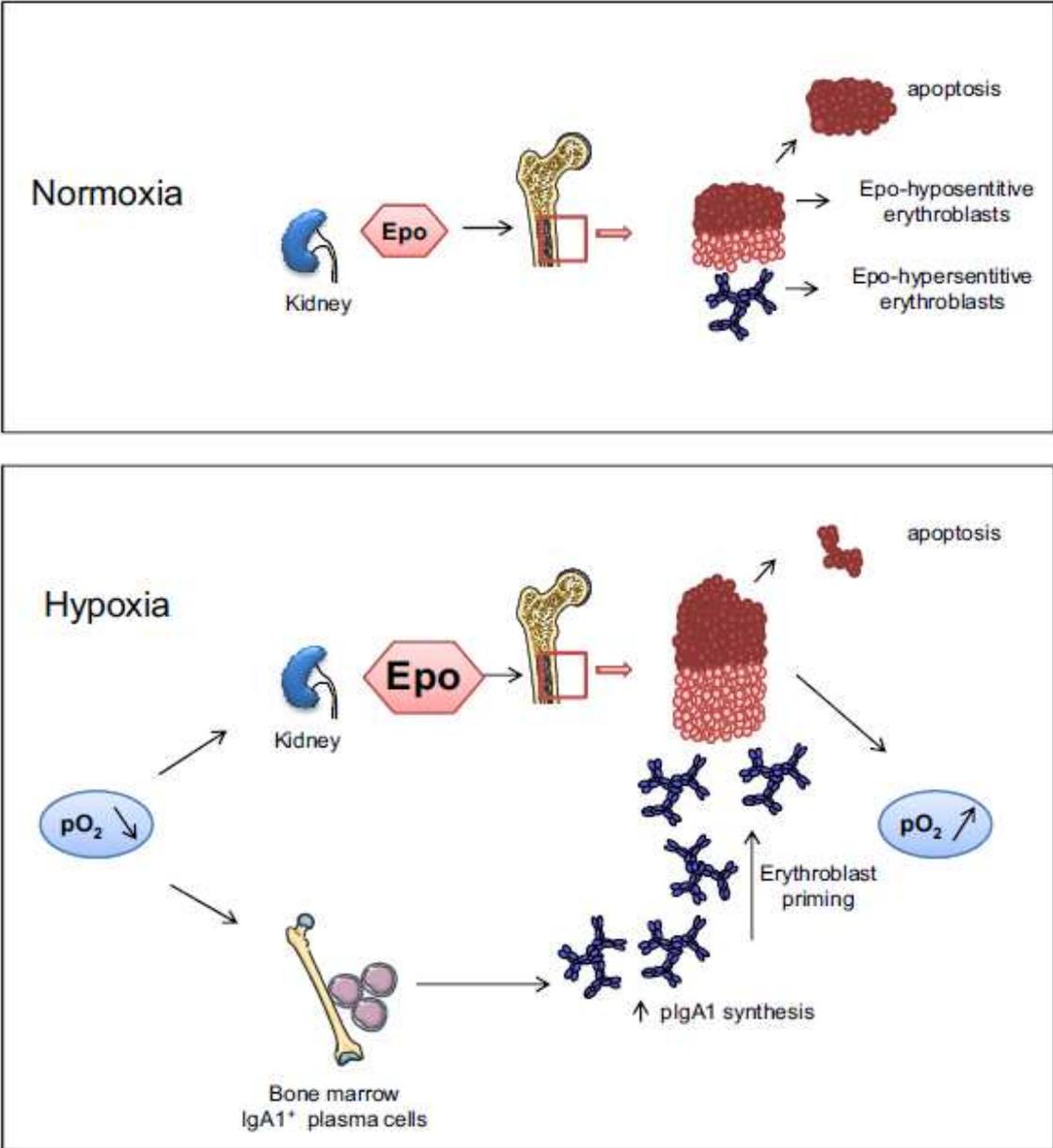


D





B



Supplemental Information

Supplementary Methods

Immunofluorescence Analysis

For binding assays, the cells (0.25×10^6) 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)¹² or with A24 (10 μg/ml at 37°C)⁵ 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 pIgA1 or IgG. The cells were then cultured for 30 min in the presence of a fluorogenic caspase substrate (Cytotoxicity, 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 (1×10^7 /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), pIgA1 (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).

Serum fractionation

A total of 0.5 ml of serum was diluted in phosphate buffer (0.05 M Na₂SO₄, 0.02 M NaH₂PO₄ [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.

Supplementary Figure Legends

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.

Supplementary Figure 2: Human erythroid cells bind pIgA1 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 α / μ R, pIgR 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 pIgA1 to TfR1 or CD89. Binding was demonstrated by co-immunoprecipitation with pIgA1-conjugated Sepharose 4B beads or with pIgA1 and F(Ab')₂ 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 µg/ml A24 or the isotype control (315.1 mAb). (E) Inhibition assays. pIgA1 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 pIgA1 binding to UT-7 cells (right). pIgA1 binding (continuous line), pIgA1 binding after cell incubation with A24 or sTfR1 (dotted line) and IgG (shaded gray). The data are representative of three independent experiments.

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 ± 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 (2×10^6 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.

Supplementary Figure 7: Effect of plgA1 on murine erythropoiesis

Human plgA1 binds murine erythroid cells expressing TfR1. (A) Human plgA1 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 plgA1 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⁺/GPA⁺ cells in the spleen was evaluated by immunofluorescence. (C) The spleen weight was evaluated at day 9 and a representative photo of spleen from α 1KI (left) and littermate controls (right) is shown. The data are expressed as data obtained from individual mice (B and C). The bars represent the means. Black triangles (α 1KI mice) and white diamonds (littermate controls), * $p < 0.05$.

Supplementary Figure 8: Role of human plgA1 in mouse erythropoiesis

(A-B) For the *in vivo* assay of steady-state erythropoiesis, NOD/SCID mice ($n=6$ per group) were injected with plgA1 or IgG (400 μ g) intravenously every two days and sacrificed at day nine. (A) BM cells were plated in duplicate in a semisolid medium supplemented with a cocktail of cytokines (as described under Material and Methods), and the BFU-E were quantified at day 9. The colony number from mice injected with plgA1 is represented by the black triangles and those with IgG by the white diamonds. * $p < 0.05$. The bars represent the

mean number of colonies. (B) The isolated mouse BM cells were stained with an antibody specific for TfR1 or TER-119 to distinguish the erythroblast populations.

(C-E) Under steady-state conditions, pIgA1 injection does not affect reticulocytes, red blood cell number and hematocrit in mice. Blood was collected at days 3, 6 and 9 to evaluate the hematocrit (C), the number of red blood cells (D) and the percentage of reticulocytes (E). The data are presented as the mean \pm SEM ($n=6$ for 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 \pm SEM. Not all parameters could be collected from all patients.

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

(A) The Epo threshold is lowered by the binding of pIgA1. 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-hyposensitive erythroblasts. In addition, hypoxia induces plgA1 production by plasma cells. plgA 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	GCAAAACAAGGCAGGGCGCTAT	TCCCTCCTTGGCCAGTGAAAA
Fc α / μ	CCGGGCCATGGGAACACTCAG	CCCAGACGGCACCAGTACTTC
pIgR	ATCAATAGCCGAGGCCTGTCC	TCTTGAAAGGGCAGTTGATGG
ASGPR	ACAATGAGGAGAGTGACCACC	CACACAGACAACCACAAGCAG