



Régulation de l'érythropoïèse : rôle des récepteurs à la transferrine et d'un phytoestrogène

Guillemette Fouquet

► To cite this version:

Guillemette Fouquet. Régulation de l'érythropoïèse : rôle des récepteurs à la transferrine et d'un phytoestrogène. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS293 . tel-02527171

HAL Id: tel-02527171

<https://theses.hal.science/tel-02527171>

Submitted on 1 Apr 2020

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.

Régulation de l'érythropoïèse : rôle des récepteurs à la transferrine et d'un phytoestrogène

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Institut Imagine

École doctorale n°582 : Cancérologie, biologie, médecine, santé
(CBMS)

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 30 septembre 2019, par

Guillemette FOUQUET

Composition du Jury :

Christian AUCLAIR Professeur, Université Paris Saclay	Président
Carole PEYSSONNAUX DR2 Inserm, Institut Cochin (U1016 - CNRS UMR 8104)	Rapporteur
Frédérique VERDIER CR1 CNRS, Institut Cochin (U1016 - CNRS UMR 8104)	Rapporteur
Didier BOUSCARY PU-PH, Institut Cochin (U1016 - CNRS UMR 8104)	Examineur
Jérôme TAMBURINI Professeur, Faculté de médecine UNIGE, Genève	Examineur
Olivier HERMINE PU-PH, Institut Imagine (U1163)	Directeur de thèse
A la mémoire d'Ivan MOURA DR2 Inserm, Institut Imagine (U1163)	Co-Directeur de thèse



SOMMAIRE

I.	LISTE DES ABREVIATIONS	5
II.	LISTE DES FIGURES	7
III.	RESUME	9
IV.	INTRODUCTION	11
1.	Généralités sur l'érythropoïèse	11
1.1.	Hématopoïèse	11
1.2.	Erythropoïèse	12
2.	Régulation de l'érythropoïèse	13
2.1.	Erythropoïétine	13
2.2.	Stem Cell Factor	15
2.3.	Interactions entre SCF et EPO	16
2.4.	régulation négative de l'érythropoïèse	16
2.5.	Autres acteurs impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse	17
3.	Principales voies de signalisation impliquées dans l'érythropoïèse	18
3.1.	JAK2	18
3.2.	STAT5	19
3.3.	PI3K/AKT	20
3.4.	MAPK/ERK	20
4.	Métabolisme du fer et récepteurs à la transferrine	22
4.1.	Rappels sur le métabolisme du fer	22
4.2.	Transferrine	24
4.3.	Autres ligands du TfR1	25
4.4.	TfR1	25
4.4.1.	Expression du TfR1	25
4.4.2.	Régulation de l'expression du TfR1	26
4.4.3.	Structure du TfR1	28
4.4.4.	Forme soluble du TfR1	29
4.4.5.	Fonction principale du TfR1 : internalisation du fer	29
4.5.	TfR2	32
4.5.1.	Expression du TfR2	32
4.5.2.	Régulation de l'expression du TfR2	32

4.5.3.	Structure du TfR2	33
4.5.4.	Forme soluble du TfR2	34
4.5.5.	Fonction principale du TfR2 : régulation de l'hepcidine	35
5.	Autres fonctions des récepteurs à la transferrine	38
5.1.	Autres fonctions du TfR1 – signalisation	38
5.1.1.	Mutations du TfR1	38
5.1.2.	Fonctions non canoniques du TfR1	38
5.1.3.	TfR1 et signalisation	39
5.1.4.	TfR1 et signalisation dans l'érythropoïèse	42
5.1.5.	TfR1 et signalisation en immunologie	44
5.2.	Autres fonctions du TfR2 – érythropoïèse	46
5.2.1.	Mutations du TfR2	46
5.2.2.	Fonction érythroïde du TfR2	46
5.2.3.	TfR2 et signalisation de l'EPO-R	50
6.	Phytoestrogènes et <i>Curcuma comosa</i>	51
6.1.	Rappels sur les œstrogènes	51
6.1.1.	Production et fonction des œstrogènes	51
6.1.2.	Récepteurs aux œstrogènes	52
6.2.	Œstrogènes et érythropoïèse	54
6.2.1.	Œstrogènes et hématopoïèse	54
6.2.2.	Œstrogènes et érythropoïèse	56
6.3.	Limites de l'utilisation thérapeutique des œstrogènes	58
6.3.1.	Bénéfices et utilisations des œstrogènes	58
6.3.2.	Effets négatifs des œstrogènes endogènes ou exogènes	59
6.4.	Phytoestrogènes	59
6.5.	<i>Curcuma comosa</i>	60
6.5.1.	Description du <i>Curcuma comosa</i>	60
6.5.2.	Propriétés médicinales du <i>Curcuma comosa</i>	62
6.5.3.	Activité œstrogénique du <i>Curcuma comosa</i>	63
V.	JUSTIFICATION DE L'ETUDE	65
VI.	RESULTATS	67
1.	Holo-transferrin potentiates erythropoietin-induced activation of major pathways involved in erythroblast proliferation and survival	67
1.1.	Short Report	67
1.2.	Autres Résultats	83

1.2.1.	Contexte	83
1.2.1.	Méthodes et résultats	84
2.	<i>Curcuma comosa</i>, a phytoestrogen, promotes erythropoiesis through activation of the estrogen receptor alpha signaling pathway	93
VII.	DISCUSSION	105
VIII.	CONCLUSION	125
IX.	ANNEXES	127
	Annexe 1 – Projet IgA polymériques et polyglobulie	127
	Annexe 2 – Projet sérotonine et hématopoïèse, Partie érythropoïèse	141
	Annexe 3 – Projet sérotonine et hématopoïèse, Revue	163
	Annexe 4 – Projet BLNK, Case report	173
	Annexe 5 – Projet cyclosporine, Revue	181
X.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	189

I. Liste des abréviations

AKT / PKB	Protéine Kinase B
Apo-Tf	Apo-transferrine
BFU-E	Burst Forming Unit-Erythroid
BMP	Bone morphogenetic protein
BMP-R	Récepteur de BMP
CD	Cluster de différenciation
CD71	Cluster de différenciation 71, autre nom du TfR1
C/EPB- α	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
CFU-GEMM	Colony Forming Unit-Granulocyte Erythrocyte Megacaryocyte Macrophage
CFU-E	Colony Forming Unit-Erythroid
CHO	Cellules d'ovaire de hamster chinois
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
DMT1	Divalent Metal Transporter 1
E2	17 β -œstradiol (œstradiol)
EPO	Erythropoïétine
ER- α	Récepteur aux œstrogènes alpha
ER- β	Récepteur aux œstrogènes bêta
ERFE	Erythroferrone
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FPN1	Ferroportine
Gab2	Grb2 (growth-factor-receptor-bound protein 2)-associated binder-2
GATA-1	GATA-binding factor 1 ou Erythroid transcription factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPER	G-protein coupled estrogen receptor
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HFE	Protéine de l'hémochromatose humaine (High Fe)
HJV	Hémojuvéline
HNF-4 α	Hepatocyte nuclear factor 4 α
Holo-Tf = Fe-Tf	Holo-transferrine = Ferro-transferrine
Hsp90	Heat shock protein 90

IFN γ	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IRE	Iron Responsive Element
IRP	Iron Responsive element binding Protein
KO	Knock-Out
LAM	Leucémie Aiguë Myéloïde
LT	Lymphocyte T
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Nitric Oxyde Synthase
NTBI	Non-transferrin bound iron
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
EPO-R	Récepteur de l'érythropoïétine
rHuEPO	Erythropoïétine recombinante humaine
ROS	Reactive Oxygen Species
SCF	Stem Cell Factor
SERM	Selective estrogen receptor modulator
SMAD	Sons of Mothers Against Decapentaplegic
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
STEAP3	Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 3
SVF	Sérum de veau fœtal
TCR	Récepteur des lymphocytes T (T-Cell Receptor)
Tf	Transferrine
TfR1	Récepteur de la transferrine 1
TfR2	Récepteur de la transferrine 2, codé par le gène du même nom
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TFRC	Gène codant pour le récepteur de la transferrine 1
Tmprss6	Matriptase-2 ou MT-2
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
WT	Wild Type (sauvage)

II. Liste des figures

Numéro	Titre	Page
1	Représentation schématique de l'hématopoïèse	10
2	Représentation schématique de l'érythropoïèse	11
3	Régulation endocrine de la production d'EPO par le rein	12
4	Liaison de l'EPO à son récepteur, changement de conformation et phosphorylation des protéines JAK2	13
5	Activation des voies STAT5, PI3K et MAPK/ERK par la liaison de l'EPO à son récepteur	18
6	Représentation schématique de la distribution du fer chez l'homme	22
7	Représentation schématique de la régulation du TfR1 par le système IRE/IRP	26
8	Différents niveaux de régulation du TfR1	27
9	Endocytose et recyclage du TfR1	30
10	Similarité de structure des récepteurs à la transferrine	33
11	Rôle du TfR2 dans la régulation de la production d'hépcidine	36
12	Le TfR1 est une molécule compétente pour la signalisation	40
13	Action des différents ligands du TfR1 sur la phosphorylation de ERK et AKT, en association avec l'EPO	42
14	Modèle hypothétique des fonctions hépatiques et érythroïdes du TfR2	48
15	Schéma simplifié de la synthèse des principaux œstrogènes	50
16	Représentation simplifiée des effets génomiques et non génomiques des récepteurs aux œstrogènes	52
17	Représentation du rôle des œstrogènes dans la régulation de l'érythropoïèse	57
18	Description du <i>Curcuma comosa</i> par William Roxburgh en 1810	60
19	Plusieurs formes du <i>Curcuma comosa</i>	60
20	Structure du 17 β -œstradiol, de la génistine et du composé ASPP 049	62
21	Résumé schématique des objectifs de ce travail	65
22	Technique de co-immunoprécipitation	84
23	Résultats des co-immunoprécipitations	85
24	Analyse de la phosphorylation de Src et Lyn par Western Blot	86
25	Technique de ligation de proximité	87

26	Résultats des expériences de Duolink®	88
27	Technique du pull down utilisant des peptides du TfR1 couplés à des billes magnétiques	89
28	Analyse des expériences de pull down par Western Blot	90
29	Résultats des co-immunoprécipitations dans les cellules UT7 TfR2-KO	91
30	Représentation schématique de notre hypothèse sur le rôle de la transferrine et de ses récepteurs dans la régulation de l'érythropoïèse, à travers leur impact sur la signalisation du récepteur à l'EPO	119
31	Représentation schématique de nos résultats sur le rôle du <i>Curcuma comosa</i> et de son composant l'ASPP 049 sur l'érythropoïèse	122

III. Résumé

Titre de la thèse : Régulation de l'érythropoïèse : rôle des récepteurs à la transferrine et d'un phytoestrogène

Contexte :

L'érythropoïèse est un processus extrêmement prolifératif, et qui doit donc être très étroitement régulé. L'érythropoïétine (EPO) est l'un des facteurs absolument nécessaires à l'érythropoïèse. Cependant, dans la moelle osseuse, la quantité d'EPO circulante est sous-optimale et la capacité des érythroblastes à survivre dépend donc de leur sensibilité à l'EPO. Les facteurs modulant la réponse à l'EPO au cours de l'érythropoïèse sont encore largement inconnus.

Nous avons donc voulu explorer plusieurs facteurs pouvant potentiellement être impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse et plus précisément dans la réponse à l'EPO : tout d'abord, la transferrine ainsi que ses récepteurs (TfR), la transferrine et le TfR1 étant également essentiels à l'érythropoïèse, ainsi qu'un phytoestrogène provenant d'une plante nommée *Curcuma comosa*, les œstrogènes étant eux aussi connus pour favoriser l'érythropoïèse.

Concernant la transferrine, nous avons voulu principalement explorer son rôle sur la signalisation, ayant récemment montré au laboratoire que le TfR1, essentiellement connu pour son rôle dans l'endocytose du fer, est également capable d'entraîner une signalisation.

Méthodes :

Pour explorer l'impact de nos différents facteurs sur la signalisation induite par l'EPO, nous avons utilisé la lignée cellulaire UT7/EPO, proche des érythroblastes humains. Nous avons testé l'impact de l'apo-transferrine, de l'holo-transferrine et d'un composant issu du *Curcuma comosa*, l'ASPP 049, sur la phosphorylation de ERK, AKT et STAT5, seuls et en coopération avec des concentrations variables d'EPO.

Nous avons également étudié l'impact de l'ASPP 049 sur des cellules érythroïdes primaires, ainsi qu'*in vivo* chez la souris.

Résultats :

Nous avons montré que la transferrine potentialise la stimulation induite par l'EPO des voies ERK, AKT et STAT5, et ce quel que soit le temps de stimulation des cellules. L'effet est plus important avec l'holo-transferrine, chargée en fer, qu'avec l'apo-

transferrine, vide de fer. Cet effet est cependant conservé même en l'absence d'endocytose du TfR1. Aucune coopération n'a été trouvée entre la transferrine et le stem cell factor (SCF).

Nous avons également observé qu'en l'absence du TfR2, il existe une augmentation de l'expression du récepteur à l'EPO et de la signalisation induite par l'EPO, sans impact de la transferrine dans ce contexte.

Par ailleurs, nous avons montré que le *Curcuma comosa* améliore la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythroïdes précoces, par un mécanisme de potentialisation de la signalisation induite par l'EPO impliquant le récepteur aux œstrogènes ER- α .

Conclusion :

En conclusion, la transferrine et ses récepteurs, ainsi qu'un phytoestrogène et l'ER- α , sont impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse via leur action sur la signalisation induite par l'EPO. L'approfondissement de ces données pourrait ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques dans le traitement de l'anémie.

IV. Introduction

1. GENERALITES SUR L'ERYTHROPOÏESE

1.1. HEMATOPOÏESE

L'hématopoïèse (du grec ancien *haíma*, *haímatos* : « sang » et *poíêsis* : « création »), est le processus par lequel l'organisme produit et renouvelle les cellules du sang. Ces cellules sont réparties en trois grandes familles que sont les globules rouges ou érythrocytes, les plaquettes, et les globules blancs ou leucocytes.

Chez l'homme, après la vie fœtale, l'hématopoïèse a lieu au sein de la moelle osseuse. Jusqu'à l'âge de 4 ans, tous les os ont une activité hématopoïétique, puis l'hématopoïèse se déroule essentiellement au niveau des os courts et des os plats.

La plupart des cellules sanguines matures ne prolifèrent pas et ont une durée de vie limitée (en moyenne 120 jours pour les globules rouges, 7 jours pour les plaquettes et 24 heures pour les polynucléaires neutrophiles), pourtant leur nombre reste constant. L'hématopoïèse est le processus qui permet la production et le renouvellement continu et finement régulé des cellules sanguines. Ce renouvellement cellulaire dynamique, maintenu pendant toute la durée de la vie humaine, est rendu possible par la présence d'une réserve de cellules souches au sein de la moelle osseuse : les cellules souches hématopoïétiques. Ces cellules pluripotentes sont à l'origine de toutes les cellules sanguines (**Figure 1**).

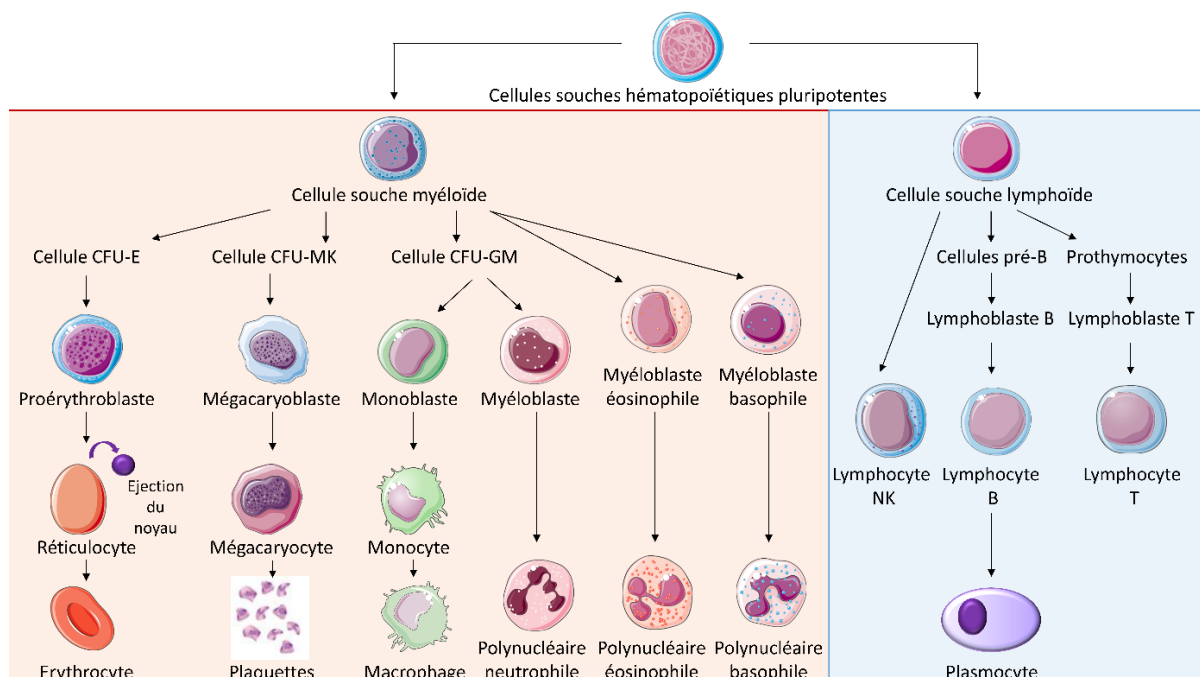


Figure 1. Représentation schématique de l'hématopoïèse.

1.2. ERYTHROPOÏÈSE

L'érythropoïèse (du grec ancien *erythros* : « rouge » et *poiêsis* : « création »), est le processus de formation des globules rouges à partir des cellules souches (**Figure 2**). La couleur rouge de ces cellules provient de leur contenu en hémoglobine, la protéine chargée de transporter l'oxygène.

A l'état basal, nous avons environ 250 milliards d'érythroblastes dans la moelle et 25 000 milliards de globules rouges dans le sang. L'érythropoïèse permet la production de deux millions de globules rouges par seconde chez l'homme, c'est donc l'un des systèmes de prolifération les plus importants de l'organisme. Ce processus nécessite une régulation fine afin de maintenir une production de globules rouges adaptée en permanence aux besoins.

Plusieurs facteurs sont absolument nécessaires à l'érythropoïèse, parmi lesquels l'érythropoïétine (EPO) et le stem cell factor (SCF). Les récepteurs à l'EPO (EPO-R) et au SCF (c-Kit) sont donc fortement exprimés au cours de l'érythropoïèse, en fonction du stade de maturation. Les érythroblastes expriment également fortement le récepteur à la transferrine de type 1 (TfR1), afin de capter le fer nécessaire à la synthèse de l'hémoglobine. La transferrine est la protéine de transport du fer, capable de se fixer au TfR1 pour induire l'entrée du fer dans la cellule. La transferrine chargée en fer est appelée holo-transferrine ou holoTf (**Figure 2**).

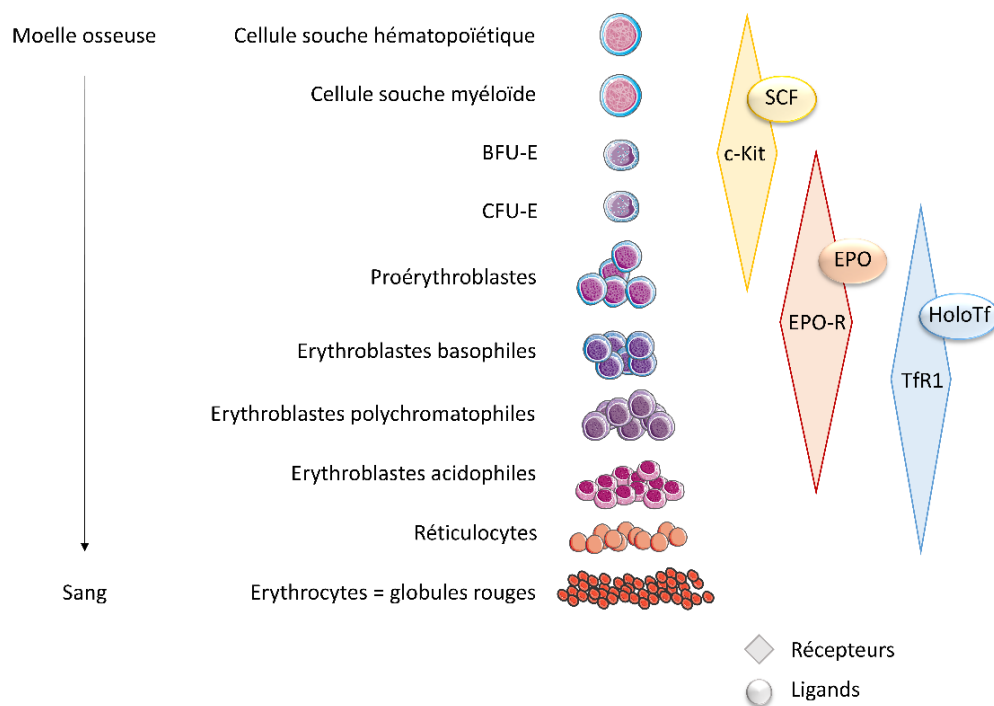


Figure 2. Représentation schématique de l'érythropoïèse.

2. REGULATION DE L'ERYTHROPOÏESE

Parmi les nombreux acteurs impliqués dans la régulation positive de l'érythropoïèse, deux facteurs de croissance sont absolument nécessaires à la production de cellules érythroïdes : le stem cell factor (SCF) et l'érythropoïétine (EPO) (Goldwasser 1984, Goldwasser et al. 1984).

2.1. ERYTHROPOÏÉTINE

L'EPO est un facteur de croissance hématopoïétique – il s'agit même du premier facteur de croissance hématopoïétique à avoir été isolé, en 1977 (Miyake et al. 1977). L'EPO est essentiellement produite par le rein (Koury et al. 1989, Maxwell et al. 1993). Une petite quantité d'EPO peut également être synthétisée par le foie (Maxwell et al. 1994), et dans une moindre mesure par le cerveau, le placenta, la rétine et les testicules (Tan et al. 1992). L'EPO se comporte comme une hormone, puisqu'une fois produite par le rein, elle va principalement agir à distance : au niveau de la moelle osseuse.

Ainsi, la synthèse rénale d'EPO doit être adaptée à la quantité de globules rouges nécessaires. Cette régulation se fait par le biais de l'hypoxie : en cas de baisse du nombre de globules rouges, l'apport en oxygène va baisser au niveau des cellules rénales, qui vont en réponse augmenter leur synthèse d'EPO. Cette augmentation de l'EPO permettra d'accroître la production des globules rouges, ce qui augmentera l'apport en oxygène au niveau des cellules rénales avec pour conséquence de diminuer la synthèse d'EPO (**Figure 3**). Cette régulation permet d'adapter la production de globules rouges aux besoins en oxygène de l'organisme.

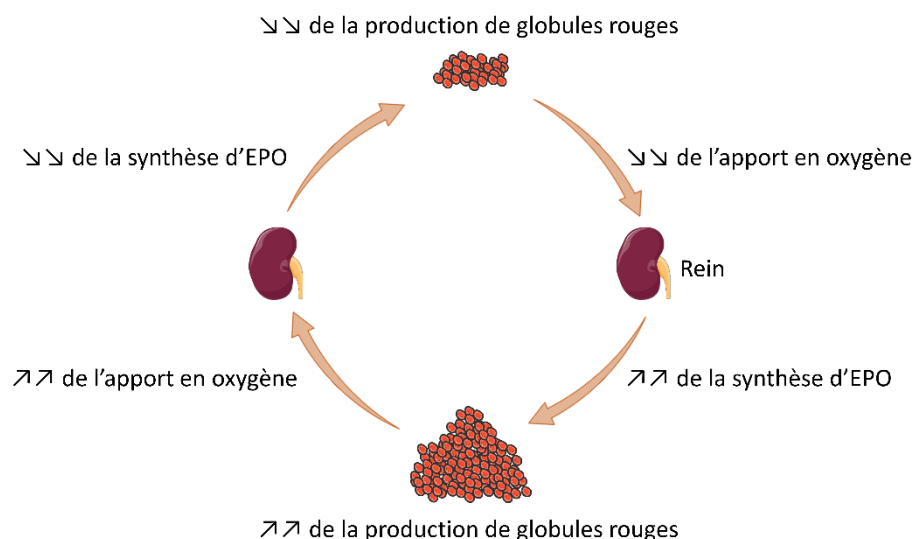


Figure 3. Régulation endocrine de la production d'EPO par le rein.

Sur le plan transcriptionnel, la production de l'EPO est stimulée par le facteur de transcription HIF (Hypoxia Inducible Factor). Ce facteur est constitué de deux sous-unités : la sous-unité α est régulée selon le niveau d'oxygène, alors que la sous-unité β est exprimée de façon constitutionnelle. On dénombre trois protéines HIF- α : HIF1- α et HIF2- α sont structurellement proches, alors que HIF3- α est, elle, moins bien connue. Schématiquement, en situation d'hypoxie, HIF2- α se lie à HIF2- β et ce complexe stimule la transcription du gène de l'EPO. En l'absence d'hypoxie, HIF2- α est dégradée par le protéasome (Gruber et al. 2007).

Le complexe HIF agit sur de nombreuses autres cibles que le gène de l'EPO, impliqués notamment dans l'angiogenèse ou le métabolisme énergétique, mais aussi dans le métabolisme du fer puisqu'il induit l'expression du TfR1 (Tacchini et al. 1999).

Ainsi, la production d'EPO est également régulée par l'homéostasie du fer. En cas de carence en fer, comme en situation d'hypoxie, le complexe HIF va stimuler la transcription du gène de l'EPO (Schofield and Ratcliffe 2004).

L'activité de l'EPO passe par sa fixation à son récepteur (EPO-R). L'EPO-R appartient à la super-famille des récepteurs aux cytokines de type 1. Il n'a pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque. Cette activité est apportée par les protéines tyrosine kinase Janus Kinase 2 (JAK2) fixées sur chaque partie intra-cellulaire du récepteur à l'EPO. En l'absence d'EPO, l'EPO-R est présent sous la forme d'un dimère inactif à la surface cellulaire. La fixation de l'EPO entraîne un changement de conformation du récepteur, ce qui induit la phosphorylation des protéines JAK2 (**Figure 4**). Cette phosphorylation est essentielle pour la transduction du signal de l'EPO-R stimulée par l'EPO (Richmond et al. 2005). Comme nous le verrons plus loin, JAK-2 a également un rôle de protéine chaperonne pour l'EPO-R.

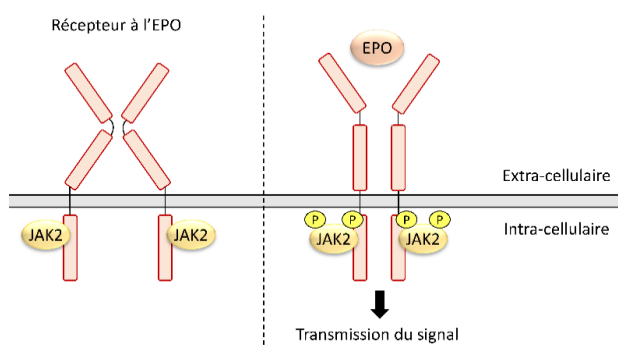


Figure 4. Liaison de l'EPO à son récepteur, changement de conformation et phosphorylation des protéines JAK2.

L'EPO-R est faiblement exprimé sur les progéniteurs érythroïdes immatures, puis son expression est maximale aux stades de BFU-E tardifs, CFU-E et érythroblastes basophiles (**Figure 2**). L'action de l'EPO n'est pas restreinte à l'érythropoïèse, puisque l'EPO-R est exprimé par les précurseurs de la lignée mégacaryocytaire (Ishibashi et al. 1987, McDonald and Sullivan 1993). L'EPO semble également avoir des fonctions au sein de certains tissus non hématopoïétiques, mais possiblement via d'autres récepteurs (Ostrowski and Heinrich 2018). L'EPO-R, lui, ne semble indispensable qu'à l'érythropoïèse, puisque les souris invalidées pour le récepteur à l'EPO dans toutes les cellules sauf celles de la lignée érythroïde sont viables (Suzuki et al. 2002).

Au niveau de la moelle osseuse, l'EPO est indispensable pour les phases terminales de l'érythropoïèse. Elle n'est pas indispensable à l'engagement précoce des cellules souches hématopoïétiques vers la voie érythroïde : en effet, les souris invalidées pour le récepteur à l'EPO sont capables de produire des progéniteurs érythroïdes précoces jusqu'au stade BFU-E et CFU-E, mais meurent au stade embryonnaire d'une anémie profonde liée à l'absence de différenciation de ces progéniteurs (Wu et al. 1995).

La quantité d'EPO circulante est sous-optimale et la capacité des érythroblastes à survivre dans la moelle osseuse dépend donc de leur sensibilité à l'EPO (Koury and Bondurant 1990)(Kelley et al. 1993). L'érythropoïèse est donc régulée par la sensibilité des progéniteurs et précurseurs érythroïdes à l'EPO. Cependant, les facteurs modulant la réponse à l'EPO au cours de l'érythropoïèse sont encore largement inconnus.

2.2. STEM CELL FACTOR

Par opposition à l'EPO, le SCF est indispensable à l'érythropoïèse précoce. Il favorise la prolifération et la survie cellulaire des cellules érythropoïétiques immatures, aux dépens de la maturation terminale des érythroblastes (Muta et al. 1995).

Le SCF est une cytokine dimérique qui existe sous deux formes : une forme soluble et une forme transmembranaire. Ces deux formes agissent en se liant au récepteur du SCF, c-Kit, mais la forme transmembranaire active c-Kit de façon plus prolongée que la forme soluble, et le stabilise à la membrane plus longtemps (Miyazawa et al. 1995).

Contrairement à l'EPO, les concentrations de SCF ne semblent pas être impactées par l'hypoxie mais seraient plutôt régulées par le niveau d'expression de son récepteur c-Kit.

Le récepteur au SCF, c-Kit, est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase de type 3. La liaison au SCF provoque une dimérisation et une auto-phosphorylation de c-Kit, ce qui permet la transmission du signal intra-cellulaire.

c-Kit est exprimé sur les progéniteurs hématopoïétiques mais aussi sur les mastocytes, ainsi que d'autres cellules non hématopoïétiques telles que les mélanocytes, les cellules interstitielles de Cajal au niveau du tube digestif, et les cellules germinales (McNiece and Briddell 1995).

2.3. INTERACTIONS ENTRE SCF ET EPO

Chez la souris comme chez l'homme, le récepteur c-Kit est exprimé des stades les plus précoces de l'érythropoïèse jusqu'au stade d'érythroblaste basophile (Katayama et al. 1993, Uoshima et al. 1995). Le récepteur à l'EPO commence à être synthétisé à des stades plus tardifs, même si le stade précis de son apparition reste encore incertain. Il est présent à partir du stade BFU-E, son expression est maximale aux stades CFU-E, proérythroblaste et érythroblaste basophile, puis son expression diminue au cours de la différenciation terminale (Wognum et al. 1990).

Au stade CFU-E, il semble que le SCF et l'EPO agissent en coopération pour la survie et la prolifération des cellules (Sui et al. 1998, Arcasoy and Jiang 2005), cependant la stimulation du récepteur à l'EPO est capable d'induire une diminution de l'expression de c-Kit (Kosmider et al. 2009). Les interactions précises entre ces deux récepteurs sont complexes, et les mécanismes de leur coopération sont encore imparfaitement élucidés.

2.4. REGULATION NEGATIVE DE L'ERYTHROPOÏÈSE

L'érythropoïèse doit également être contrôlée par des régulateurs négatifs : le principal mécanisme de régulation négative implique le système Fas/Fas-ligand au sein de l'îlot érythroblastique. Au sein de cet îlot, cohabitent des cellules érythroïdes à différents stades de maturation : des cellules « précoces » (précurseurs immatures et progéniteurs érythroïdes) qui expriment le récepteur de mort Fas, et des érythroblastes plus matures (notamment polychromatophiles et acidophiles) qui expriment le ligand

de Fas (De Maria et al. 1999). L'activation du récepteur Fas par son ligand induit l'apoptose des cellules immatures en excès, évitant ainsi un emballement de l'érythropoïèse.

Certaines cytokines telles que le TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha), l'IFN γ (Interféron gamma), l'IL-1 (interleukine-1) ou le TGF- β (transforming growth factor beta) sont capables de réguler négativement la prolifération des progéniteurs érythroïdes, notamment via l'inhibition de la synthèse d'EPO.

Les autres aspects de la régulation négative de l'érythropoïèse ne seront pas détaillés dans le cadre de cette thèse, mais sont discutés notamment dans la revue suivante (Liang and Ghaffari 2016).

2.5. AUTRES ACTEURS IMPLIQUES DANS LA REGULATION DE L'ÉRYTHROPOÏÈSE

De nombreux autres facteurs interviennent dans la régulation de l'érythropoïèse. Le fer est un de ces facteurs, puisqu'il est un constituant important de l'hémoglobine, mais également un élément indispensable aux enzymes nécessaires à la prolifération cellulaire. Le TfR1 est donc essentiel à l'érythropoïèse puisqu'il permet l'endocytose du fer, cependant son rôle indépendamment de l'entrée du fer est encore peu connu.

De nombreuses hormones jouent également un rôle, notamment les hormones thyroïdiennes (Bauer et al. 1998), les hormones rénales du système rénine/angiotensine (Cole et al. 2000), l'insuline-like growth factor-1 (IGF-1) (Shimon and Shpilberg 1995), ou encore les androgènes (Malgor et al. 1998) et les glucocorticoïdes (Wessely et al. 1997). Ces hormones, si elles ne sont pas indispensables à l'érythropoïèse, ont dans l'ensemble une action favorable sur celle-ci. L'action des œstrogènes a été peu étudiée dans ce contexte, mais sera abordée dans le chapitre 6.

Par ailleurs, il a été démontré que les molécules d'adhésion telles que les intégrines étaient particulièrement importantes pour l'érythropoïèse tardive : l'adhésion des cellules à la fibronectine pourrait même être plus essentielle que la présence d'EPO lors des dernières phases de la différenciation terminale (Lodish et al. 2010).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au rôle de la transferrine et ses récepteurs ainsi que d'un phytoestrogène dans la régulation de l'érythropoïèse.

3. PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS L'ÉRYTHROPOÏÈSE

Un des moyens d'étudier l'impact de différents facteurs sur l'érythropoïèse est d'analyser l'activation des voies de signalisation impliquées dans l'érythropoïèse. Ces voies sont nombreuses, nous détaillerons ci-dessous les trois principales voies activées lors de l'érythropoïèse que sont les voies STAT5, PI3-kinase/AKT et MAPkinases/ERK.

A noter qu'afin d'éviter une suractivation de ces voies, il existe un contrôle par régulation négative (Vainchenker and Constantinescu 2013), mais que nous ne détaillerons pas ici.

3.1. JAK2

JAK2 est une protéine kinase de la famille JAK (Janus Activated Kinase). Elle joue un rôle central dans la signalisation cellulaire des cytokines et des facteurs de croissance, permettant l'émission de signaux de survie et de prolifération cellulaire. Elle se lie au récepteur de l'EPO, mais également aux autres grands récepteurs myéloïdes que sont le récepteur de la thrombopoïétine (TPO-R, ou MPL pour myeloproliférative leukemia), et le récepteur du G-CSF (G-CSF-R).

Comme les autres membres de la famille JAK, JAK2 est composée d'un domaine kinase actif, d'un domaine pseudokinase qui régule négativement le domaine kinase, d'un domaine SH2 (Src Homology 2) qui permet l'interaction avec d'autres protéines, et d'un domaine de liaison à la partie cytosolique des récepteurs aux cytokines (Yamaoka et al. 2004).

JAK2 a deux fonctions distinctes en lien avec l'EPO-R. Dans un premier temps, JAK2 joue le rôle de protéine chaperonne, favorisant l'expression de l'EPO-R à la surface cellulaire indépendamment de son activité kinase (Huang et al. 2001). Comme nous l'avons vu ci-dessus (**Figure 4**), la fixation de l'EPO à son récepteur entraîne une modification de conformation de l'EPO-R et l'activation de JAK2 par auto-phosphorylation. JAK2, via son activité kinase, va ensuite recruter des protéines impliquées dans les voies de signalisation STAT5, PI3K/AKT et MAPK/ERK (**Figure 5**) (Vainchenker and Constantinescu 2013).

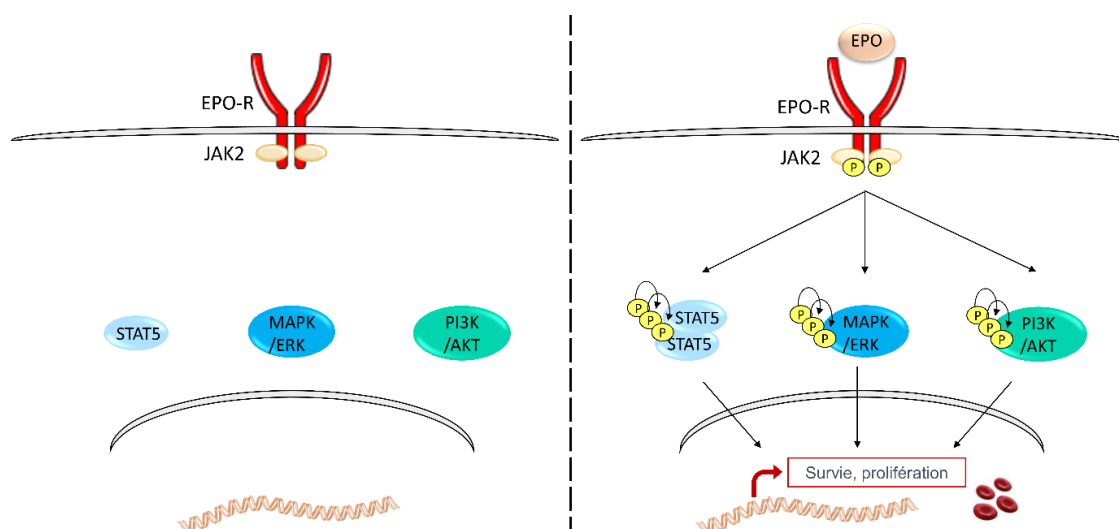


Figure 5. Activation des voies STAT5, PI3K et MAPK/ERK par la liaison de l'EPO à son récepteur.

3.2. STAT5

STAT5 est un membre de la famille des facteurs de transcription STAT. Il est composé d'une tyrosine phosphorylable par JAK2, d'un domaine SH2, d'un domaine transactivateur ainsi que d'un domaine de fixation à l'ADN. JAK2 est également capable de phosphoryler STAT1 et STAT3, mais ces derniers, même s'il a été montré qu'ils pouvaient agir dans la régulation de l'érythropoïèse (Kirito et al. 2002, Halupa et al. 2005), ont une place moins essentielle que STAT5. Les souris déficientes en STAT5a et STAT5b, les deux isoformes de STAT5, présentent une anémie microcytaire profonde responsable d'une forte mortalité précoce (embryonnaire ou périnatale) (Kerenyi et al. 2008).

Les deux isoformes de STAT5, STAT5a et STAT5b, présentent plus de 96% d'homologie sur le plan protéique. Leur activation par phosphorylation induit la formation d'homo ou d'hétérodimères STAT5a/b puis leur translocation dans le noyau pour jouer leur rôle de facteur de transcription, favorisant la prolifération et la survie des cellules.

STAT5 est particulièrement important au moment de l'érythropoïèse terminale. Il a été montré que l'expression d'une forme constitutivement active de STAT5 dans des progéniteurs érythroïdes humains permettait la différenciation terminale même en l'absence d'EPO (Garcon et al. 2006). De même, chez la souris, une forme constitutivement active de STAT5 permet même le maintien d'une érythropoïèse normale en l'absence de l'EPO-R et de JAK2 (Grebien et al. 2008).

3.3. PI3K/AKT

Dans l'érythropoïèse, la voie PI3K/AKT (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase / protein kinase B) est activée par l'EPO, le SCF, ainsi que l'IL-3 et l'IL-6, et joue principalement un rôle dans la survie et le contrôle du stress cellulaire. La PI3K de classe Ia est un hétérodimère formé par une sous-unité catalytique : p110, et une sous-unité régulatrice : p85. Cette sous-unité p85 possède des domaines SH2 lui permettant d'interagir avec de nombreuses tyrosines phosphorylées.

La fixation de l'EPO à l'EPO-R, ou du SCF à son récepteur, entraîne, par différents mécanismes, l'activation de la PI3kinase par phosphorylation. Cette activation induit la production du 3' phospho-inositol (PIP3), qui va se fixer sur AKT et aboutir à son activation. La voie PI3K/AKT protège les précurseurs érythroïdes de l'apoptose (Haseyama et al. 1999). La délétion de la sous-unité p85 de la PI3K entraîne, chez la souris, une anémie profonde avec diminution marquée de la prolifération des précurseurs érythroïdes (Huddleston et al. 2003). La PI3K agit à la fois en protégeant de l'apoptose et en stimulant la prolifération des précurseurs érythroïdes, en réponse à une stimulation par l'EPO (Bouscary et al. 2003).

La voie PI3K/AKT est par ailleurs essentielle à de nombreux types cellulaires, elle peut être activée par de nombreux stimuli et entraîner des réponses cellulaires variées. Ainsi, malgré une préservation partielle de l'érythropoïèse, la mutation de la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K est létale *in utero* (Fruman et al. 2000).

3.4. MAPK/ERK

Une troisième grande voie activée au cours de l'érythropoïèse est la voie MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase / extracellular signal-regulated kinase). Elle est impliquée dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire.

La voie des MAP kinases peut être activée par plusieurs mécanismes différents éventuellement associés, impliquant l'activation de Ras. Parmi les isoformes de Ras, seule K-Ras semble être indispensable pour l'érythropoïèse (Khalaf et al. 2005), et son inactivation est létale *in utero* chez la souris (Johnson et al. 1997, Koera et al. 1997). Ras, une fois activé, induit une cascade de signalisation qui va aboutir, entre autres, à l'activation de la voie ERK1/2.

ERK1 et ERK2, également appelées p44 et p42 MAP kinases, sont des kinases activées par phosphorylation en aval de Ras (Turjanski et al. 2007). Une fois activées, elles peuvent phosphoryler de nombreuses cibles au niveau membranaire, du cytosquelette, mais aussi nucléaire. La voie ERK1/2 est activée par l'EPO et par le SCF dans les érythroblastes humains, séparément mais également en synergie (Sui et al. 1998). Cette voie est impliquée dans la prolifération et la survie des érythroblastes, et il a été montré que l'inhibition spécifique de la voie ERK1/2 diminue la croissance des érythroblastes humains (Sui et al. 1998).

D'autres voies de signalisation, non détaillées ici, sont activées au cours de l'érythropoïèse : notamment les voies JUNK (Jacobs-Helber and Sawyer 2004), p38 (Uddin et al. 2004), les SRC kinases telles que Src (Okutani et al. 2001), Lyn (Kosmider et al. 2009) ou plus récemment Fyn (Beneduce et al. 2019), BTK (von Lindern et al. 2004), ou encore la signalisation induite par le calcium (Hirschler-Laszkiewicz et al. 2009).

4. METABOLISME DU FER ET RECEPTEURS A LA TRANSFERRINE

Le premier récepteur à la transferrine à avoir été mis en évidence est le TfR1, principalement connu pour son rôle d'internalisation du fer. Le TfR2, de structure très similaire au TfR1, est principalement connu pour réguler la production d'hepcidine par les hépatocytes. Ces deux récepteurs sont exprimés au cours de l'érythropoïèse, cependant leurs fonctions exactes dans ce contexte ne sont pas entièrement élucidées.

4.1. RAPPELS SUR LE METABOLISME DU FER

Le fer est un cofacteur essentiel à de nombreux processus biologiques, notamment le transport d'oxygène, le transport d'électrons et la respiration mitochondriale, la synthèse d'ADN, et la croissance et la prolifération cellulaire. Cependant, il peut également être toxique, puisque son aptitude à gagner ou perdre des électrons le rend capable de participer à des réactions potentiellement délétères car génératrices de radicaux libres (ROS pour Reactive Oxygen Species) (Touati 2000). Le stress oxydatif lié à la production de radicaux libres a des effets pro-apoptotiques et délétères pour les membranes cellulaires, et peut entraîner des dommages oxydatifs à caractère mutagène sur l'ADN. Le métabolisme du fer doit donc être finement régulé.

Le fer existe sous deux états d'oxydation : le fer ferreux (Fe(II) ou Fe^{2+}) et le fer ferrique (Fe(III) ou Fe^{3+}). Le fer ferreux Fe^{2+} libre est toxique, tandis que le fer ferrique Fe^{3+} libre est insoluble. Le fer circule donc dans le plasma principalement lié à la transferrine, sous forme Fe^{3+} .

Le fer peut exister sous forme d'hème, de clusters fer-soufre, ou de fer labile qui est la forme minoritaire. La principale fonction des clusters fer-soufre est le transfert d'électron, qui repose sur la capacité des atomes de fer à osciller entre les états d'oxydation Fe^{2+} et Fe^{3+} . Ils fonctionnent comme des cofacteurs pouvant moduler la structure et l'activité des protéines et ont donc des rôles variés, en dehors de leur rôle de cofacteurs essentiels au sein de la chaîne respiratoire dans la mitochondrie (Lill 2009).

Dans les cellules, 65% du fer est présent sous forme héminique : il s'agit de l'hème, présente dans l'hémoglobine, la myoglobine ou les enzymes respiratoires, et 35% du fer est stocké dans la ferritine sous forme non héminique : ce fer correspond aux réserves intracellulaires et est facilement mobilisable.

A l'échelle de l'organisme, le métabolisme du fer fonctionne quasiment en circuit fermé. Un organisme adulte contient environ 3 à 5 g de fer. L'absorption quotidienne correspond aux pertes, qui sont d'environ 1 à 2 mg par jour. Le fer circulant lié à la transferrine ne représente que 0,1% du fer total. La majorité du fer de l'organisme est contenue dans les précurseurs érythroïdes et les globules rouges matures, le reste du fer étant essentiellement stocké dans le foie et les macrophages. Les macrophages permettent également le recyclage du fer des globules rouges sénescents, pour qu'il puisse être réutilisé (**Figure 6**).

L'hepcidine est une hormone majeure dans l'homéostasie du fer (Nicolas et al. 2001, Pigeon et al. 2001). Elle permet de diminuer les taux de fer en limitant l'absorption intestinale de fer ainsi que le relargage de fer par les macrophages. Sa production est régulée par des stimuli provenant du statut en fer, de l'érythropoïèse, de l'hypoxie ainsi que de l'inflammation. Elle est principalement produite par le foie, même si de nombreuses cellules expriment de faibles niveaux d'hepcidine. Les souris déficientes en hepcidine spécifiquement au niveau du foie, comme les souris déficientes en hepcidine de façon globale, présentent une surcharge en fer sévère (Zumerle et al. 2014).

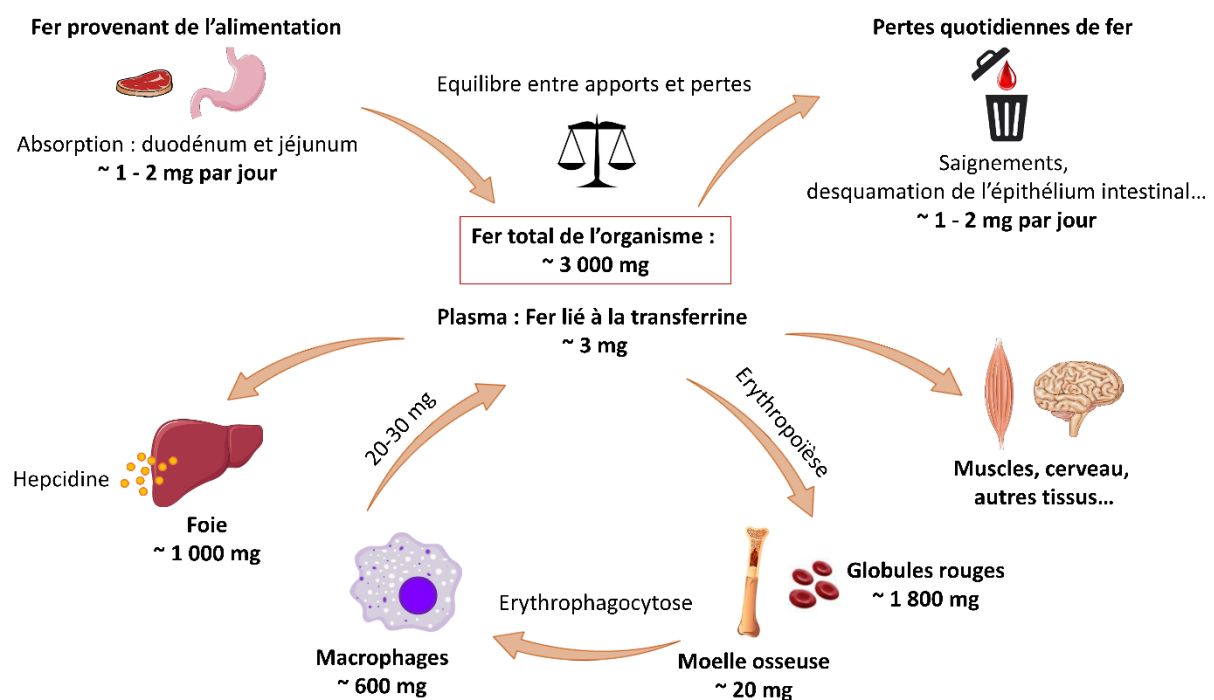


Figure 6. Représentation schématique de la distribution du fer chez l'homme.

4.2. TRANSFERRINE

La transferrine est le principal transporteur sérique du fer (Schade and Caroline 1946). C'est une glycoprotéine bilobée de 76 kDa, chacun de ses lobes pouvant lier une molécule de fer sérique (Fe^{3+}) – ou d'un autre ion métallique, tel que le gallium, l'aluminium, le zinc ou le cadmium, avec des affinités différentes (Messori and Kratz 1994). En fonction du pH, la conformation de la transferrine ainsi que sa liaison au fer peuvent être modifiées. Ainsi, lorsque le pH est acide, la conformation de la transferrine devient ouverte, ce qui facilite la libération de fer de son site de liaison (Princiotta and Zapolski 1976). Il a été montré que la conformation de la transferrine change aussi lors de sa liaison au TfR1 (Cheng et al. 2004).

La transferrine est appelée ferro-transferrine (Fe-Tf) ou holo-transferrine (Holo-Tf) lorsqu'elle est liée à deux molécules de fer, et apo-transferrine (Apo-Tf) lorsqu'elle n'est pas liée au fer. On peut également trouver de la transferrine monoferrrique, c'est-à-dire liée à une seule molécule de fer. La concentration de la transferrine humaine sérique est de 200 à 300 mg/dL et sa demi-vie est d'environ 8 jours. Le coefficient de saturation de la transferrine, obtenu en divisant la concentration du fer sérique par la capacité totale de fixation de la transferrine, est habituellement proche de 30% (30 μM). On considère qu'un coefficient de saturation inférieur à 20% indique une carence martiale, et qu'un taux supérieur à 50% indique une surcharge martiale. Lorsque le coefficient de saturation de la transferrine atteint 80-85%, des niveaux toxiques de fer non lié à la transferrine (ou NTBI pour non-transferrin bound iron) apparaissent dans le sérum.

Les souris présentant un déficit congénital en transferrine meurent d'anémie sévère par carence martiale, associée à une surcharge martiale massive dans les tissus non hématopoïétiques (Trenor et al. 2000).

La transferrine est principalement produite par le foie, mais également en plus petites quantités par les testicules et le cerveau (Idzerda et al. 1986). Sa production est régulée par de nombreux facteurs, dont la carence martiale, l'inflammation, ou encore l'hypoxie (Idzerda et al. 1986, Rolfs et al. 1997).

Plusieurs études se sont intéressées à d'autres fonctions potentielles de la transferrine. En effet, l'apo-transferrine semble avoir un rôle anti-microbien via la réduction des concentrations de fer libre (von Bonsdorff et al. 2004), et via l'inhibition de l'adhésion des bactéries (Ardehali et al. 2003). Il a également été suggéré que la

transferrine puisse avoir un rôle anti-oxydant, ou d'agent stimulateur de l'érythropoïèse (Gomme et al. 2005).

4.3. AUTRES LIGANDS DU TfR1

D'autres ligands du TfR1 ont été identifiés, tels que la protéine de l'hémochromatose (HFE pour High Fe), la ferritine H, ou les immunoglobulines IgA.

Les IgA sont divisées en deux sous-classes : les IgA1 principalement retrouvées au niveau sérique, et les IgA2 principalement retrouvées au niveau des muqueuses. Des travaux réalisés précédemment au laboratoire ont permis de montrer que les immunoglobulines sériques A1 faisaient partie des ligands du TfR1 (Moura et al. 2001). Cette interaction entre IgA et TfR1 a été étudiée dans le cadre de la néphropathie à IgA (Moura et al. 2004, Moura et al. 2005), ainsi que dans la maladie cœliaque (Matysiak-Budnik et al. 2008). Plus récemment, la poursuite des travaux menés au laboratoire a démontré que l'interaction entre IgA1 polymériques et TfR1 jouait un rôle bénéfique dans la régulation de l'érythropoïèse (Coulon et al. 2011).

Certains virus et parasites utilisent également le TfR1 pour entrer dans les cellules, comme les virus du genre Arénavirus qui peuvent causer des fièvres aiguës hémorragiques (Radoshitzky et al. 2007), le virus de l'hépatite C (Martin and Uprichard 2013), ou le *Plasmodium vivax* (Gruszczyk and Kanjee 2018).

4.4. TfR1

4.4.1. EXPRESSION DU TfR1

Le récepteur à la transferrine de type 1 ou TfR1, également appelé CD71 (cluster de différenciation 71), est codé chez l'homme par le gène *TFRC* (transferrin receptor).

Chez les mammifères, toutes les cellules, à l'exception des érythrocytes matures, expriment le TfR1 (Trowbridge and Shackelford 1986). Le nombre de molécules de TfR1 présentes à la surface d'une cellule est variable, principalement en fonction de l'état de prolifération de la cellule. Ainsi, les cellules qui prolifèrent fortement, comme les précurseurs hématopoïétiques, les lymphocytes B et T activés, les ostéoclastes, les cellules de la crypte intestinale ou encore certaines cellules tumorales, expriment fortement le TfR1 (Ponka and Lok 1999, Roodman 2009, Wieland and Shipkova 2016).

Au cours de l'érythropoïèse, le TfR1 commence à être exprimé à la surface cellulaire entre les stades BFU-E et CFU-E, lorsque les cellules commencent à être dépendantes de l'EPO (Li et al. 2014) (**Figure 2**). L'expression du TfR1 continue ensuite à augmenter jusqu'au stade érythroblaste basophile tardif, elle est maximale au stade polychromatophile, puis diminue à partir du stade érythroblaste acidophile (Shintani et al. 1994, An et al. 2014). Les réticulocytes expriment encore le TfR1 mais les érythrocytes matures en sont totalement dépourvus.

4.4.2. REGULATION DE L'EXPRESSION DU TfR1

Rôle du fer et système IRE/IRP

Les protéines impliquées dans le métabolisme du fer sont fréquemment régulées au niveau de l'ARN messager par un système IRE/IRP (Iron Responsive Element / Iron Responsive element binding Protein). Les IRE sont des structures en épingle à cheveux composées de 25 à 30 nucléotides, situées à l'extrémité 5' ou 3' des ARN messagers. Les IRP1 et 2 sont des protéines capables de reconnaître les IRE et de se lier à l'ARN. Globalement, en l'absence de fer, les IRP se lient aux IRE pour moduler la traduction des ARN messagers. En présence de fer, les IRP sont utilisés ou dégradés et ne peuvent pas se lier aux IRE, ce qui produit une régulation inverse. Ce système IRE/IRP est donc régulé par le contenu intra-cellulaire en fer, et permet de moduler l'expression de leurs cibles en inhibant la traduction ou en stabilisant le transcrit (Wilkinson and Pantopoulos 2014).

Ainsi, si le contenu de la cellule est riche en fer, ce système permettra de favoriser la traduction de protéines qui utilisent beaucoup de fer, et d'arrêter l'acquisition du fer notamment via la dégradation de l'ARN messager du TfR1. Si le contenu de la cellule est pauvre en fer, le système IRE/IRP permettra d'augmenter l'acquisition du fer, notamment via l'augmentation de l'expression du TfR1 (**Figure 7**).

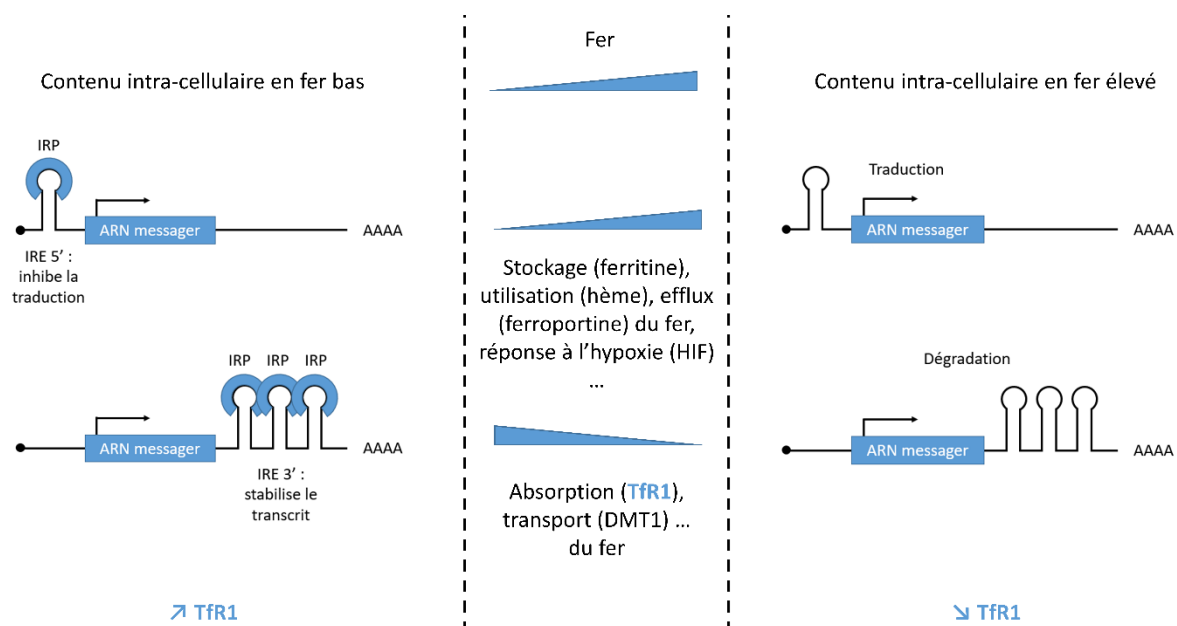


Figure 7. Contrôle de la stabilité de l'ARN messenger du TfR1 par le système IRE/IRP.

Dans les cellules érythroïdes, en situation normale, il existe une moindre régulation négative et les protéines IRP continuent à promouvoir l'entrée du fer en continu afin de favoriser la synthèse d'hémoglobine (Schranzhofer et al. 2006).

Rôle de STAT5

En complément de ce système IRE/IRP qui stabilise l'ARN messenger du TfR1, l'expression de TfR1 est également contrôlée par STAT5 sur le plan transcriptionnel. Comme nous l'avons vu, STAT5 est un élément important dans la signalisation induite par l'EPO. Il régule l'expression du TfR1 de deux manières : il est capable de se lier au premier intron du gène du TfR1 pour augmenter sa transcription (Zhu et al. 2008), et promeut l'expression de la protéine IRP2 qui stabilise l'ARN messenger du TfR1 (Kerenyi et al. 2008) et donc favorise l'augmentation de l'expression de TfR1.

Rôle de l'hypoxie

L'hypoxie régule positivement l'expression du TfR1, de manière directe et indirecte. Il existe d'une part un mécanisme indirect, lié au système IRE/IRP, puisque l'hypoxie augmente l'expression d'IRP1 et sa liaison aux IRE (Toth et al. 1999). D'autre part, l'hypoxie semble avoir un effet direct puisqu'un élément de réponse à l'hypoxie a été identifié dans le promoteur du gène du TfR1 (*TFRC*) (Lok and Ponka 1999,

Tacchini et al. 1999). L'hypoxie augmente l'expression des facteurs induits par l'hypoxie, HIF-1 α et HIF-2 α , et permet à ces protéines de se fixer sur l'élément de réponse à l'hypoxie, entraînant une augmentation de l'expression du TfR1 (Xu et al. 2017). La régulation de l'expression du TfR1 se déroule donc à plusieurs niveaux (**Figure 8**).

A noter que l'hypoxie joue un rôle plus large dans l'homéostasie globale du fer, notamment via la régulation de l'expression d'autres gènes impliqués dans le métabolisme du fer (Peyssonnaud et al. 2008).

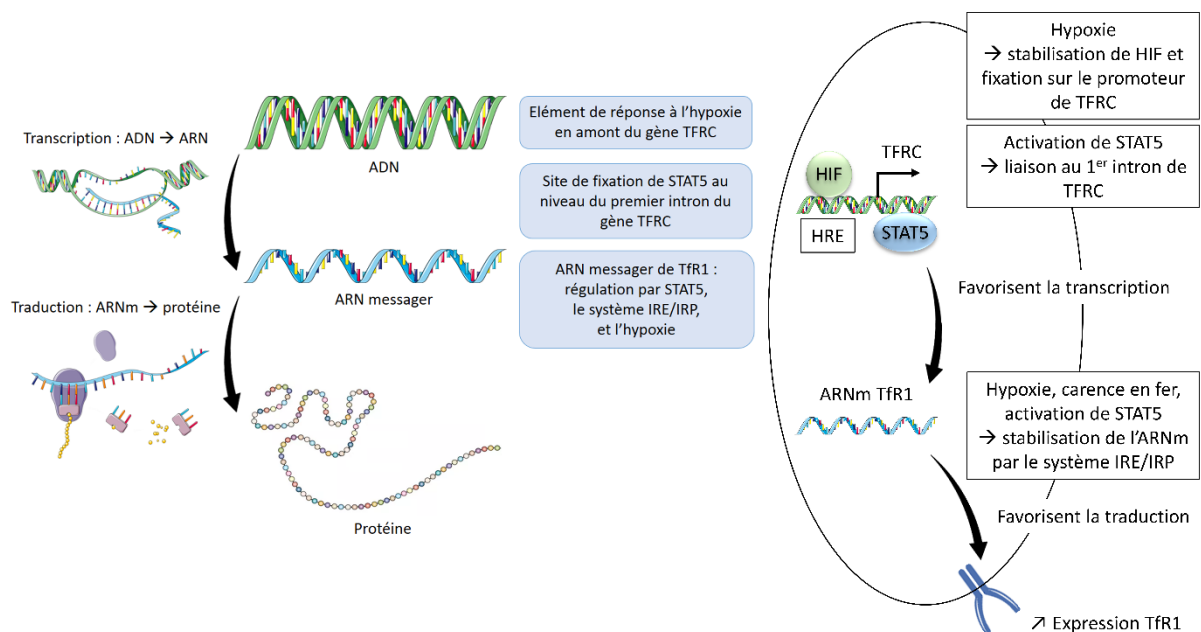


Figure 8. Différents niveaux de régulation du TfR1.

4.4.3. STRUCTURE DU TfR1

Le TfR1 est une glycoprotéine transmembranaire de type 2, dimérique, composée de 760 acides aminés répartis en trois domaines : extra-cellulaire, transmembranaire et intra-cellulaire. Chaque sous-unité du dimère a un poids moléculaire d'environ 90 kDa.

Le domaine extra-cellulaire (671 acides aminés) contient notamment le domaine de liaison à la transferrine ainsi qu'un domaine de dimérisation spécifique à la famille des récepteurs à la transferrine (Moura et al. 2015). Le domaine transmembranaire (20 acides aminés) est suivi par un court domaine intra-cellulaire (67 acides aminés) qui contient 6 résidus phosphorylés (Y²⁰, S³⁴, T⁵² et possiblement S¹⁹, T²¹ et S²⁴) ainsi qu'un motif d'internalisation YXX ϕ (Y²⁰ TRF²³) (Schneider et al. 1984, Schneider and Williams 1985).

4.4.4. FORME SOLUBLE DU TfR1

Le TfR1 existe également sous une forme soluble (sTfR1). Cette forme tronquée est dépourvue de ses domaines transmembranaire et intra-cellulaire (acides aminés 1 à 100) (Shih et al. 1990) et circule principalement sous la forme d'un monomère soluble associé à la transferrine (Beguin 2003). Il peut également exister des complexes formés de deux monomères associés à une molécule de transferrine, ou plus rarement des dimères intacts du TfR1 circulant dans des exosomes (Johnstone 1992). Le sTfR1 est produit par protéolyse, libérant la partie extra-cellulaire du récepteur membranaire (Baynes et al. 1994).

La majorité du sTfR1 provient des cellules érythroïdes, et principalement des réticulocytes. Le taux de sTfR1, qui peut être mesuré dans le sérum, est directement corrélé à la quantité de TfR1 membranaires (R'Zik et al. 2001). Bien que sa fonction reste incertaine, le sTfR1 semble être un marqueur du statut en fer et de l'activité érythropoïétique.

Ainsi, une stimulation de l'érythropoïèse (anémie hémolytique, polyglobulie...) sera associée à une augmentation du sTfR1, et une diminution de l'érythropoïèse (aplasie médullaire, aplasie post-chimiothérapie, hypertransfusion, insuffisance rénale chronique...) sera associée à une diminution du sTfR1 (Beguin 2003).

Le relargage du sTfR1 est également régulé par son ligand, l'holo-transferrine. La liaison de l'holo-transferrine au TfR1 diminue le relargage du sTfR1 et inversement puisque le TfR1, lorsqu'il n'est pas lié à l'holo-transferrine, peut être rejeté dans le sérum en grande quantité sous forme soluble. En cas de carence martiale, le sTfR1 sera donc augmenté (et la ferritine basse). En revanche, en cas d'anémie inflammatoire, le sTfR1 sera normal et la ferritine normale ou haute. Si la ferritine peut être utilisée comme marqueur des réserves en fer de l'organisme, le sTfR1 est un marqueur plus spécifique d'une carence martiale au sein de l'érythropoïèse (Beguin 2003).

4.4.5. FONCTION PRINCIPALE DU TfR1 : INTERNALISATION DU FER

Le TfR1 représente la principale voie d'entrée du fer dans les cellules.

Les deux sous-unités du dimère de TfR1 sont liées par deux ponts disulfures situés juste au-dessus de la membrane plasmique. Le TfR1 dimérique peut lier deux molécules de transferrine. Chaque molécule de transferrine peut lier deux molécules

de fer ferrique Fe^{3+} , avec une très forte affinité : en effet, la constante de dissociation ou K_d , qui est la concentration du ligand (ici, Fe^{3+}) suffisante pour obtenir l'occupation de la moitié des récepteurs (ici, la transferrine) est très basse, environ 10^{-23} mol/L à un $\text{pH}=7,4$ (Aisen et al. 1978). L'holo-transferrine se lie ensuite au TfR1 avec une forte affinité (K_d à environ 10^{-9} mol/L) (Lebron et al. 1998, West et al. 2000). L'affinité du TfR1 pour la transferrine monoferrique (liée à une seule molécule de fer) ou l'apo-transferrine est nettement moins forte, 30 fois et 500 fois inférieure à son affinité pour l'holo-transferrine, respectivement (Young et al. 1984).

Une fois la transferrine liée au TfR1, ce complexe TfR1-transferrine va entrer dans la cellule par une endocytose clathrine dépendante. Le complexe est internalisé dans une vésicule recouverte de clathrine, ce manteau de clathrine disparaissant une fois la vésicule dans le cytoplasme. Cette vésicule d'endocytose fusionne avec un endosome, l'ensemble prenant alors le nom d'endosome. Pendant la maturation de cet endosome, le pH s'acidifie jusqu'à atteindre un pH à 5,5. A ce pH acide, les molécules de fer ferrique Fe^{3+} vont se détacher de la transferrine, qui reste, elle, associée au TfR1. En effet, le TfR1 se lie préférentiellement à l'holo-transferrine au pH sérique (7,4), mais se lie préférentiellement à l'apo-transferrine à pH acide (Wally et al. 2006). Le fer ferrique Fe^{3+} est ensuite réduit en fer ferreux Fe^{2+} par une métalloréductase telle que STEAP3 (Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 3), puis le Fe^{2+} est exporté dans le cytoplasme par DMT1 (Divalent Metal Transporter 1). Une fois dans le cytoplasme, le fer peut être stocké sous forme de ferritine, ou utilisé par la cellule par exemple pour la synthèse de l'hème. Cependant, dans les cellules érythroïdes, il semble que le fer puisse être directement transféré de l'endosome vers la mitochondrie (Sheftel et al. 2007), ce qui permet de garder un statut de « carence en fer » au niveau du cytoplasme.

Le TfR1 et la transferrine sont ensuite recyclés à la surface cellulaire, où l'apo-transferrine se détache du TfR1 (De Domenico et al. 2008) (**Figure 9**).

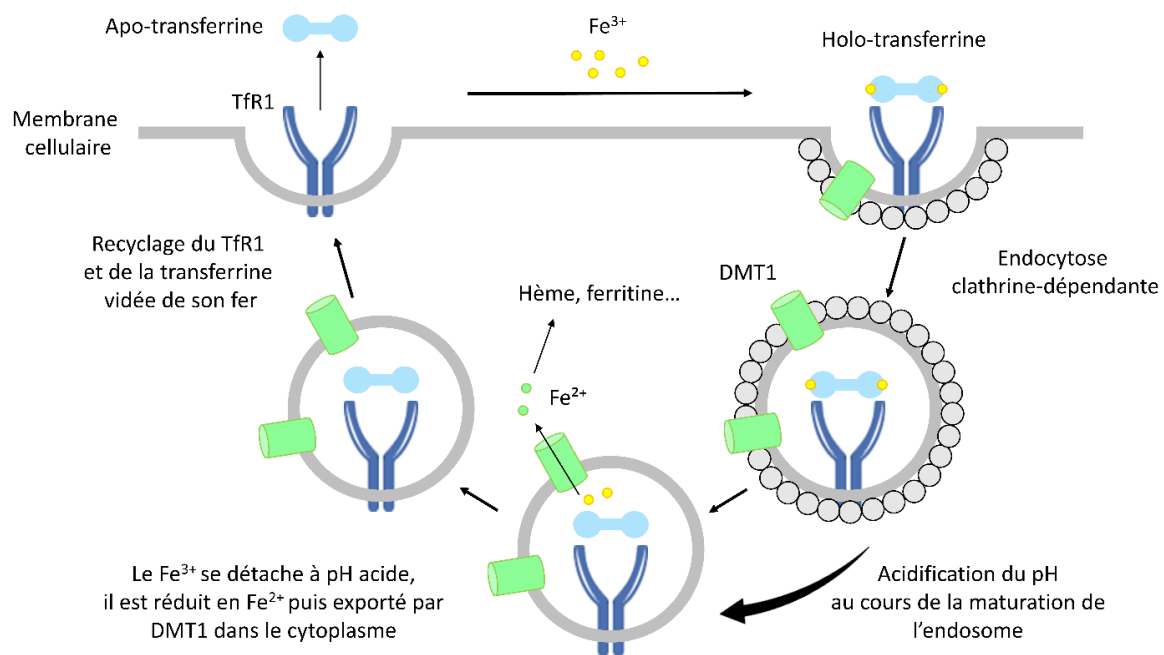


Figure 9. Endocytose et recyclage du TfR1.

Par son rôle dans l'internalisation du fer, le TfR1 est donc crucial pour l'érythropoïèse. Les souris déficientes en TfR1 meurent pendant l'embryogenèse avant le jour E12,5, par un défaut d'érythropoïèse mais également une altération du développement neurologique (Levy et al. 1999). Contrairement aux souris déficientes en transferrine qui n'ont de carence martiale qu'au niveau hématopoïétique, les souris déficientes en TfR1 présentent une carence martiale dans tous les tissus.

Le TfR1 serait également capable d'internaliser le fer lié à la ferritine : dans ce cas, la ferritine semble se dissocier du TfR1 dans les endosomes et être orientée vers les lysosomes pour être dégradée (Li et al. 2010). La ferritine est composée de 24 sous-unités H (*heavy*) et L (*light*), mais seules les sous-unités H peuvent interagir avec le TfR1 (Li et al. 2010). Il semble que seules les cellules exprimant fortement le TfR1, comme les érythroblastes, puissent incorporer la ferritine via le TfR1 (Sakamoto et al. 2015), ce qui suggère que plusieurs molécules de TfR1 pourraient être nécessaires pour l'endocytose de la ferritine.

Le rôle exact de la ferritine une fois internalisée via le TfR1 n'est pas encore parfaitement compris. Cependant, il a été montré que la ferritine H était capable d'inhiber l'hématopoïèse normale chez la souris (Broxmeyer et al. 1989) et de réprimer les réponses immunitaires en modulant les fonctions des cellules dendritiques *in vitro* (Gray et al. 2002).

4.5. TfR2

4.5.1. EXPRESSION DU TfR2

Le gène *TfR2* codant pour une protéine du même nom, le récepteur à la transferrine de type 2 ou TfR2, est un homologue du gène du TfR1 (Kawabata et al. 1999).

Le gène *TfR2* possède au moins 2 transcrits issus de promoteurs alternatifs, appelés TfR2- α et TfR2- β (Kawabata et al. 1999). Le TfR2- α est la forme complète, membranaire, fortement exprimée au niveau des hépatocytes et de la lignée érythroïde mais également au niveau de l'estomac ainsi que par certaines cellules tumorales (Calzolari et al. 2007). Le TfR2- β est une forme plus courte, exclusivement cytoplasmique, qui serait exprimée à de faibles niveaux par de nombreux types cellulaires (Deaglio et al. 2002). Le rôle de cette forme intracellulaire tronquée n'est pas bien caractérisé, même si certaines données murines suggèrent un rôle du TfR2- β dans le contrôle transcriptionnel de la ferroportine dans la rate (Roetto et al. 2010). Pour la suite de ce manuscrit, nous utiliserons le terme de TfR2 pour désigner la forme membranaire complète, TfR2- α .

En dehors de son expression bien établie au niveau des hépatocytes et de la lignée érythroïde, dont nous parlerons plus loin, quelques études se sont intéressées à l'expression du TfR2 sur d'autres types cellulaires : par exemple, Rishi *et al.* ont étudié le rôle du TfR2 dans les macrophages (Rishi et al. 2016). Dans un modèle de souris déficientes en TfR2 spécifiquement sur les macrophages, les auteurs ont pu montrer que le TfR2 des macrophages n'était pas nécessaire à l'homéostasie du fer, mais qu'il semblait impliqué dans la régulation de la ferroportine des macrophages (Rishi et al. 2016).

Le TfR2 est aussi exprimé dans le système osseux, sur les ostéoclastes, les ostéoblastes et les ostéocytes. Un KO du TfR2 spécifiquement sur les ostéoblastes entraîne une augmentation de la masse osseuse, via une inhibition de la voie BMP-MAPK et une activation de la voie Wnt dans ces cellules (Rauner et al. 2019).

4.5.2. REGULATION DE L'EXPRESSION DU TfR2

La régulation de l'expression du TfR2 est différente de celle du TfR1. En effet, le système IRE/IRP ne semble pas intervenir puisque les transcrits du TfR2 ne possèdent

pas de séquence IRE (Fleming et al. 2000). L'expression du TfR2 ne semble donc pas régulée par la quantité de fer disponible, que ce soit en situation de surcharge ou de chélation martiale (Kawabata et al. 2000). En revanche, l'ARN messager du TfR2 semble régulé par l'état de prolifération des cellules, puisqu'il varie selon le cycle cellulaire (Kawabata et al. 2001).

Le promoteur du TfR2 est stimulé par différents facteurs de transcription en fonction des cellules, tels que GATA-1 (GATA-binding factor 1 ou Erythroid transcription factor) dans les précurseurs érythroïdes, C/EPB- α (CCAAT/enhancer-binding protein alpha) dans les cellules myéloïdes, les hépatocytes et les tissus adipeux, ou encore HNF-4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) au niveau de l'épithélium intestinal et du foie (Matsuo et al. 2015).

La protéine TfR2- α est régulée négativement par le CD81, une molécule d'adhésion qui forme des complexes avec le TfR2- α au niveau des radeaux lipidiques et favorise sa dégradation (Chen and Enns 2015). Il a été suggéré que la protéine TfR2- α pouvait être régulée positivement par l'holo-transferrine (Robb and Wessling-Resnick 2004), qui augmente son expression au niveau protéique et favorise sa localisation à la membrane cellulaire (Pagani et al. 2015). Cette régulation positive du TfR2 par l'holo-transferrine a été démontrée dans des hépatocytes, dans la lignée érythroïde UT7 et dans des érythroblastes humains (Pagani et al. 2015), mais n'a pas été retrouvée dans la lignée érythroleucémique K562 (Johnson and Enns 2004).

4.5.3. STRUCTURE DU TfR2

La structure primaire du TfR2 est très similaire à celle du TfR1. En effet, le TfR2 présente 39% d'identité et 53% de similarité avec le TfR1 dans son ensemble, et leurs domaines extra-cellulaires présentent 45% d'identité et 66% de similarité (Kawabata et al. 1999). Comme le TfR1, le TfR2 est une glycoprotéine membranaire de type 2 formant des homodimères. Des associations entre TfR1 et TfR2, sous forme d'hétérodimères, ont également été décrites (Vogt et al. 2003).

De façon similaire au TfR1, le TfR2 est composé de 801 acides aminés répartis en trois domaines : extra-cellulaire, transmembranaire et intra-cellulaire (**Figure 10**). Chaque sous-unité du dimère a un poids moléculaire d'environ 95 kDa, les deux sous-unités étant liées par deux ponts disulfures. Le domaine extra-cellulaire (698 acides aminés) contient notamment le domaine de liaison à la transferrine ainsi qu'un

domaine de dimérisation spécifique à la famille des récepteurs à la transferrine (Moura et al. 2015). Le domaine transmembranaire (23 acides aminés) est suivi par un court domaine intra-cellulaire (78 acides aminés) qui contient un motif d'internalisation YXX ϕ (Y²³ QRV²⁶) (Johnson et al. 2007). A noter que le TfR2 comporte un signal de ciblage mitochondrial, non présent dans le TfR1, en intra-cellulaire (Mastroberardino et al. 2009).

L'isoforme TFR2- β ne possède pas les exons 1 à 3, qui correspondent à la partie transmembranaire et la partie intra-cellulaire, et est donc uniquement composé de la partie extra-cellulaire (Kawabata et al. 1999). Cependant, il n'est pas certain que cette isoforme existe sur le plan protéique, et elle n'est de toute façon pas exprimée à la surface cellulaire.

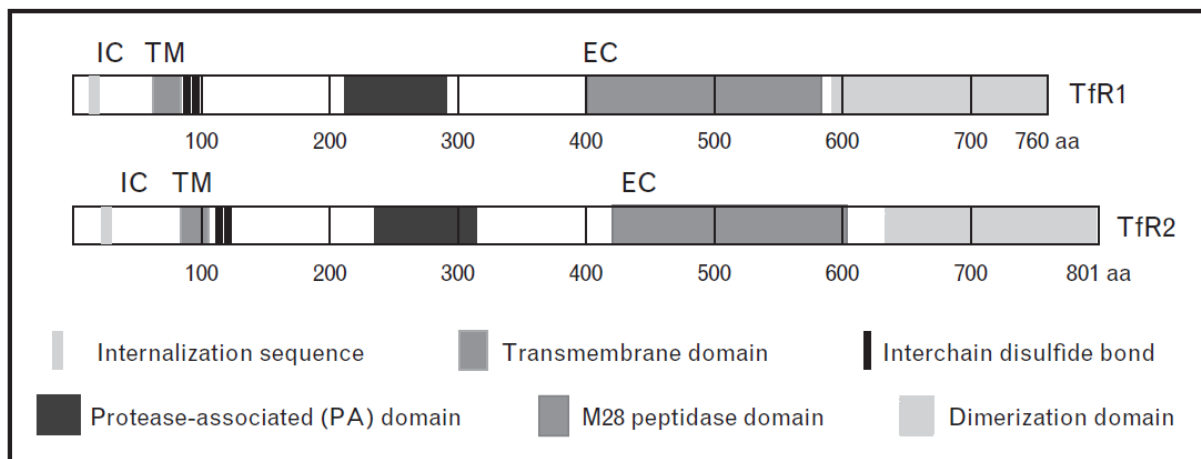


Figure 10. Similarité de structure des récepteurs à la transferrine, figure issue de Moura et al. (Moura et al. 2015).

4.5.4. FORME SOLUBLE DU TFR2

Tout comme le TfR1, le TfR2 a une forme soluble (sTfR2) composée du domaine extracellulaire du TFR2 et produite par clivage de la forme complète lorsqu'elle est à la membrane (Pagani et al. 2015).

Le sTfR2 est, comme le sTfR1, régulé par son ligand, l'holo-transferrine. En présence d'holo-transferrine, il a été montré que l'expression totale et de surface du TfR2 augmentait, alors que la forme soluble sTfR2 diminuait (Pagani et al. 2015). Comme l'affinité de l'holo-transferrine est plus faible pour le TfR2 que pour le TfR1, il est possible que le relargage de sTfR2 survienne avant le relargage du sTfR1 en cas de diminution des concentrations d'holo-transferrine. Bien que sa fonction reste encore

inconnue, le sTfR2 pourrait donc être un marqueur de carence martiale plus précoce que le sTfR1 dans l'érythropoïèse.

4.5.5. FONCTION PRINCIPALE DU TfR2 : REGULATION DE L'HEPCIDINE

Malgré une structure très similaire, le TfR1 et le TfR2 ont des fonctions différentes. En effet, même si le TfR2 est également capable de lier la transferrine, il a pour principale fonction de réguler la production d'hepcidine par les hépatocytes en fonction des concentrations circulantes de fer (Chen and Enns 2012).

De nombreux acides aminés impliqués dans la liaison du TfR1 à la transferrine sont conservés dans le TfR2, qui peut donc aussi lier la transferrine (Giannetti et al. 2003). Cependant, l'affinité du TfR2 pour l'holo-transferrine est environ 25 fois plus faible que celle du TfR1 pour l'holo-transferrine, avec une constante de dissociation K_d autour de 27 nmol/L (Moura et al. 2015). De la même manière que pour le TfR1, le TfR2 se lie à l'holo-transferrine à pH neutre et à l'apo-transferrine à pH acide (West et al. 2000).

La protéine de l'hémochromatose, HFE (pour High Fe), est une protéine membranaire atypique, similaire aux protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 1, et associée à la bêta-2 microglobuline. HFE est une protéine régulatrice qui permet d'éviter l'accumulation du fer, en inhibant l'absorption intestinale du fer en cas de surcharge en fer via sa liaison au transporteur DMT1 ainsi qu'au TfR1, mais également en agissant sur la production d'hepcidine notamment via sa liaison au TfR2. HFE est donc capable d'interagir avec le TfR1 (Bennett et al. 2000) et avec le TfR2 (Chen et al. 2007, D'Alessio et al. 2012).

Lorsque HFE se lie au TfR1, elle entre en compétition avec la transferrine car leurs sites de liaison au TfR1 se chevauchent (Giannetti and Bjorkman 2004). Dans des conditions de faible saturation de la transferrine, où la forme prédominante de la transferrine sera monoferrique, HFE et la transferrine sont en équilibre concurrentiel pour la liaison au TfR1. HFE va donc partiellement empêcher la liaison de la transferrine au TfR1, ce qui diminue l'entrée de fer dans les cellules. Dans ces conditions, l'expression du TfR2 à la membrane ne serait pas stable. En effet, il a été suggéré que l'holo-transferrine pouvait stabiliser le TfR2 (Robb and Wessling-Resnick 2004, Pagani et al. 2015), qui en son absence serait dirigé vers une voie de dégradation par les lysosomes (Johnson et al. 2007).

En revanche, dans des conditions de forte saturation de la transferrine, la forme prédominante sera l'holo-transferrine et le TfR1 fixera préférentiellement cette holo-transferrine. La liaison de la transferrine au TfR1 libérerait donc HFE, qui serait alors disponible pour interagir avec le TfR2 (Worthen and Enns 2014). En effet, HFE et la transferrine ne semblent pas être en compétition pour la liaison au TfR2 (Chen et al. 2007).

Le TfR2, en plus de sa capacité à lier la transferrine et HFE, semble également interagir avec l'hémojuvéline (HJV), le co-récepteur du récepteur de BMP (BMPR ; BMP pour bone morphogenetic protein) (D'Alessio et al. 2012). Ces deux protéines sont impliquées dans la régulation de l'hépcidine : dans le foie, HJV se lie au récepteur de BMP de type II, ce qui augmente la signalisation liée au récepteur de BMP et entraîne l'expression d'hépcidine (Xia et al. 2008). Ces quatre protéines (TfR2, HFE, HJV et BMPR) sont capables de former un complexe. De plus, des mutations de TfR2 (Kawabata et al. 2005, Nemeth et al. 2005), HFE (Ahmad et al. 2002) ou HJV (Papanikolaou et al. 2004) entraînent toutes une surcharge martiale, ce qui suggère un rôle pour ce complexe dans la régulation de l'hépcidine. Ainsi, comme nous le verrons plus loin, la principale conséquence d'une mutation inactivatrice du TfR2 sera une surcharge martiale.

Il a été montré que la liaison de la transferrine au TfR2 pouvait entraîner une activation de la voie de signalisation MAPK/ERK (Calzolari et al. 2006), et que l'interaction entre TfR2 et HFE était nécessaire pour la régulation de l'expression de l'hépcidine liée à la transferrine (Gao et al. 2009). Il a donc été proposé que la signalisation dépendante de la transferrine impliquant TfR2 et HFE agisse via la voie MAPK/ERK, qui croise la voie de signalisation HJV/BMPR impliquant les SMAD, voie principale d'activation de l'expression de l'hépcidine (Ramey et al. 2009, Poli et al. 2010, Vujic Spasic et al. 2013) (**Figure 11**). Cependant, la signalisation du TfR2 est encore mal connue et l'interaction même entre TfR2 et HFE reste controversée (Rishi et al. 2013).

L'hépcidine, principalement produite par le foie, va ensuite permettre de diminuer les taux de fer circulant en limitant l'absorption intestinale de fer ainsi que le relargage de fer par les macrophages. Cette action implique la ferroportine, qui est la seule protéine connue permettant d'exporter le fer hors des cellules. L'hépcidine se lie à la ferroportine exprimée sur les entérocytes, les macrophages et les hépatocytes, provoquant son internalisation et sa dégradation au sein des lysosomes (Nemeth et al.

2004). Dans les globules rouges, un nouveau processus de blocage de la ferroportine par l'hepcidine a récemment été décrit : dans ces cellules, la liaison de l'hepcidine est capable d'occlure la ferroportine, probablement via un changement de conformation, bloquant ainsi l'efflux de fer sans provoquer l'internalisation ni la dégradation de la ferroportine (Aschemeyer et al. 2018, Zhang et al. 2018).

Une élévation chronique de l'hepcidine entraînera une carence martiale (Nicolas et al. 2002), alors qu'un déficit en hepcidine entraînera une surcharge en fer (Nemeth and Ganz 2006).

Une carence en fer, une anémie ou encore une hypoxie diminuent, alors que l'inflammation augmente, l'expression d'hepcidine.

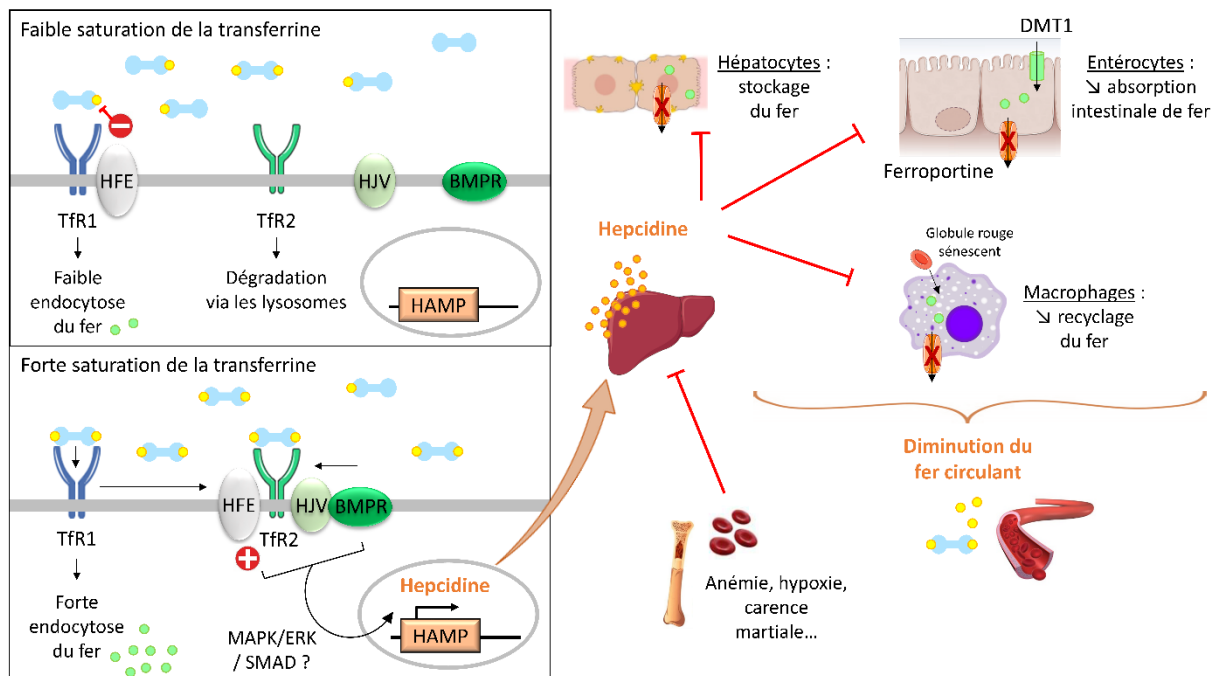


Figure 11. Rôle du TfR2 dans la régulation de la production d'hepcidine.

5. AUTRES FONCTIONS DES RECEPTEURS A LA TRANSFERRINE

5.1. AUTRES FONCTIONS DU TfR1 – SIGNALISATION

5.1.1. MUTATIONS DU TfR1

Comme mentionné précédemment, un déficit complet en TfR1 n'est pas viable chez la souris. Les souris déficientes en TfR1 meurent pendant l'embryogenèse, par un défaut d'érythropoïèse mais également une altération du développement neurologique (Levy et al. 1999). Des mutations ponctuelles du TfR1 peuvent entraîner des carences martiales plus modérées (Conway et al. 2018).

Plusieurs études se sont intéressées au rôle du TfR1 au niveau d'un organe en particulier, en réalisant des KO du TfR1 spécifiques d'organes ou de tissus. L'absence de TfR1 au niveau des neurones dopaminergiques provoque une neurodégénérescence (Matak et al. 2016), et son absence s'avère catastrophique notamment pour le métabolisme des muscles (Barrientos et al. 2015) et du cœur (Xu et al. 2015). Les souris présentant une délétion du TfR1 spécifique au niveau du foie sont viables et ne présentent pas de pathologie hépatique apparente (Fillebeen et al. 2019). Ces souris présentent cependant une teneur en fer hépatique diminuée et des perturbations de l'homéostasie du fer impliquant l'hepcidine (Fillebeen et al. 2019).

Chez l'homme, il n'y avait pas jusqu'ici de mutation du gène *TRFC* impliquée dans une pathologie. Certains polymorphismes ont été identifiés mais aucune mutation non-sens n'a été rapportée à ce jour, possiblement en raison du caractère trop pathogène d'une telle mutation. Plus récemment, une mutation du domaine intracellulaire de TfR1 au niveau du motif d'endocytose (tyrosine 20 : Y²⁰) a été décrite, chez des patients présentant un tableau de déficit immunitaire (Jabara et al. 2016).

5.1.2. FONCTIONS NON CANONIQUES DU TfR1

La plupart des travaux réalisés sur la fonction de TfR1 se sont concentrés sur son rôle établi comme récepteur d'entrée du fer, mais des données plus récentes ont montré que le TfR1 participe en réalité à de nombreuses fonctions cellulaires.

Premièrement, l'endocytose du TfR1 n'est pas spécifique d'un ligand (Cao et al. 2010) et de nombreuses molécules ou pathogènes (Radoshitzky et al. 2007, Martin and Uprichard 2013, Gruszczuk and Kanjee 2018) peuvent utiliser le TfR1 pour entrer dans les cellules.

Ensuite, comme discuté ci-dessus, TfR1 interagit avec HFE au niveau du foie, et entre donc en jeu dans la régulation de l'expression de l'hepcidine, hormone impliquée dans l'homéostasie du fer (Lebron et al. 1998, Schmidt et al. 2008, Fillebeen et al. 2019).

La maladie cœliaque est une entéropathie résultant d'une réponse immunitaire anormale aux peptides dérivés du gluten. Chez les patients atteints de maladie cœliaque, le TfR1 est surexprimé au sein de l'épithélium intestinal et est capable de fixer des IgA polymériques. Il a été suggéré que le TfR1, en favorisant l'entrée de peptides nocifs dans la muqueuse intestinale, pourrait être impliqué dans la pathogenèse de cette maladie (Matysiak-Budnik et al. 2008).

Il a également été montré que le TfR1 est nécessaire à la prolifération et à l'homéostasie des cellules épithéliales intestinales (Chen et al. 2015). Les souris déficientes en TfR1 au niveau intestinal présentent une mortalité précoce, avec de graves perturbations de l'intégrité épithéliale, des inclusions lipidiques et un défaut de prolifération. Dans cette étude, une surcharge forcée en fer ne permettait pas de corriger le phénotype, suggérant que la carence en fer n'était pas en cause dans cette mortalité précoce. En revanche, l'expression transgénique d'un TfR1 muté incapable de se lier à l'holo-transferrine permettait la correction du phénotype, soulevant l'hypothèse d'un rôle du TfR1 indépendant de l'endocytose du fer dans les cellules épithéliales intestinales (Chen et al. 2015).

Le TfR1 semble par ailleurs impliqué dans la formation de la synapse immune dans les lymphocytes T (Batista et al. 2004), ainsi que dans d'autres fonctions cellulaires telles que la morphologie et la fonction des mitochondries (Senyilmaz et al. 2015), ou la survie cellulaire notamment tumorale (Jian et al. 2011).

5.1.3. TfR1 ET SIGNALISATION

Plusieurs études ont suggéré une implication du TfR1 dans des voies de signalisation.

Le TfR1 semble avoir un rôle dans la signalisation de NF- κ B (Kenneth et al. 2013) (nuclear factor-kappa B, membre de la super-famille des facteurs de transcription impliqués dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire). Cependant, ce rôle pourrait être plus directement lié aux modifications des apports en fer dans la cellule, puisqu'une chélation en fer peut entraîner une inhibition de NF- κ B (Li and Frei

2006, Messa et al. 2010) alors qu'une augmentation du fer semble augmenter l'activation de NF- κ B (Ornstein and Zacharski 2007). Ainsi, un ajout de fer paraît avoir le même effet qu'une surexpression du TfR1 sur l'activation de NF- κ B (Kenneth et al. 2013).

Une étude a identifié le TfR1 comme étant une cible de l'acide gambogique, un xanthone cytotoxique – les xanthones étant des pigments naturels jaunes présents dans de nombreuses plantes et fleurs, classés dans les phénols naturels. L'acide gambogique est utilisé en médecine traditionnelle chinoise comme anti-cancéreux (Asano et al. 1996). Sachant que le TfR1 est surexprimé dans de nombreux cancers, les auteurs se sont intéressés au lien entre ces deux molécules et ont montré que la liaison de l'acide gambogique au TfR1 entraînait une activation rapide de l'apoptose dans plusieurs lignées de cellules tumorales (Kasibhatla et al. 2005). Cet effet semblait indépendant de l'apport en fer puisqu'il était conservé après ajout de fer ou d'un chélateur du fer, et indépendant de l'endocytose du TfR1 qui paraissait bloquée par la liaison à l'acide gambogique (Kasibhatla et al. 2005).

Par la suite, il a été montré que l'apoptose était induite via des voies de signalisation impliquant notamment la caspase 3, la caspase 8, et les MAPKinases (Jian et al. 2011). La phosphorylation du TfR1 dans sa partie intra-cellulaire au niveau de la tyrosine 20 (Y²⁰) rendait les cellules moins sensibles à l'apoptose induite par la liaison de l'acide gambogique (Jian et al. 2011). Ces résultats suggèrent que le TfR1, en plus de son rôle d'apport de fer pour les cellules cancéreuses, pourrait également, par son rôle de signalisation, être responsable d'un mécanisme de résistance à l'apoptose induite par les traitements.

Une autre étude a démontré que le TfR1 était nécessaire pour la différenciation des cellules chondrogéniques et ostéogéniques au cours de la morphogenèse crânio-faciale (Lei et al. 2016). Les auteurs ont pu montrer que le TfR1 était requis pour l'activation des voies de signalisation du TGF- β et des BMP (bone morphogenetic protein), qui sont des voies critiques pour le développement crânio-facial (Lei et al. 2016). Puisque l'activation de la signalisation du TGF- β et des BMP dépend de leur endocytose médiée par les clathrines (Di Guglielmo et al. 2003, Hartung et al. 2006), et puisque le regroupement des molécules de TfR1 à la surface cellulaire favorise l'initiation de l'endocytose dépendante des clathrines (Liu et al. 2010), ils ont fait l'hypothèse que le TfR1 pourrait contrôler l'activation de ces voies en jouant sur l'endocytose des récepteurs du TGF- β et des BMP.

Par la suite, des travaux réalisés au laboratoire ont pu démontrer de façon plus directe la fonction de signalisation du TfR1 (Coulon et al. 2011).

Pour étudier cette fonction, des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO) ont été transfectées avec un TfR1 humain. A24, un anticorps monoclonal anti-TfR1 développé au sein du laboratoire (Moura et al. 2004), a été utilisé pour stimuler ce TfR1 humain. Cette stimulation par A24 a rapidement induit une mobilisation du calcium dans les cellules CHO transfectées (**Figure 12**, issue de Coulon *et al.* (Coulon et al. 2011)). A noter que cette mobilisation calcique était maximale dans les cellules transfectées avec un TfR1 humain de type sauvage, diminuée dans les cellules transfectées avec un TfR1 muté, et nulle avec un vecteur vide (Mock). Le mutant de TfR1 présentant la plus faible mobilisation calcique était celui présentant une mutation sur la tyrosine 20 (Y²⁰), cet acide aminé étant connu pour faire partie du motif d'internalisation du TfR1 (Collawn et al. 1990).

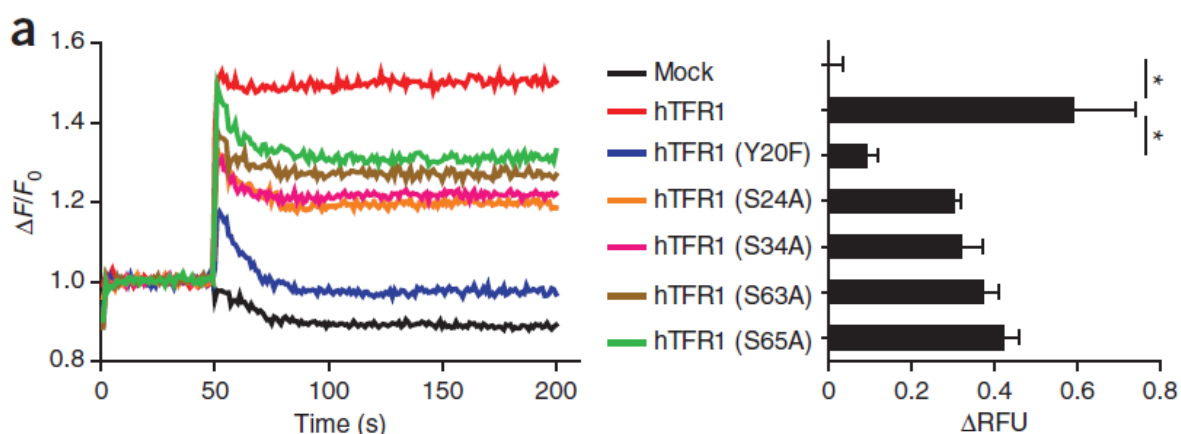


Figure 12, issue de Coulon *et al.* (Coulon et al. 2011). **Le TfR1 est une molécule compétente pour la signalisation.**

(a) Variations des concentrations intracellulaires de calcium dans des cellules CHO transfectées avec du TfR1 humain sauvage, avec cinq mutants différents de TfR1 (Y20F, S24A, S34A, S63A ou S65A), ou avec un vecteur vide (Mock), puis stimulées avec l'anticorps monoclonal A24. Les variations sont exprimées sous forme de différence entre les concentrations intracellulaires de calcium de base et après stimulation par A24 ($\Delta F/F_0$) (à gauche). A droite, quantification exprimée comme la surface moyenne sous les courbes (ΔRFU) $\pm$ erreur-type de la moyenne. * $P < 0,05$. $n = 4$.

5.1.4. TfR1 ET SIGNALISATION DANS L'ÉRYTHROPOÏÈSE

Dans ces travaux, la signalisation propre au TfR1 était indépendante du récepteur au SCF et du récepteur à l'EPO (Coulon et al. 2011), qui sont absents dans les cellules CHO.

Cependant, dans ce travail, il a été montré que les IgA1 polymériques, qui sont un des ligands du TfR1 (Moura et al. 2001), pouvaient potentialiser les effets de l'EPO à faible dose (concentration sous-optimale physiologique) sur la survie et la prolifération des érythroblastes, ainsi que sur l'activation des voies de signalisation MAPK/ERK et PI3K/AKT (**Figure 13** (Coulon et al. 2011)). L'action des IgA1 polymériques nécessite la présence d'EPO, et est perdue à fortes concentrations d'EPO, suggérant que les IgA1 polymériques potentialisent l'action de l'EPO mais ne la remplacent pas.

Dans ce travail, les auteurs suggéraient que l'holo-transferrine, mais non l'apo-transferrine, pouvait également potentialiser la phosphorylation de ERK et AKT induite par l'EPO. Ce signal semblait spécifique de la liaison au TfR1, puisque l'anticorps anti-TfR1 A24 potentialisait également ces réponses (**Figure 13**, voir page suivante).

Les IgA1 étant produites dans la moelle osseuse, à proximité des érythroblastes, elles pourraient participer à la modulation de la sensibilité à l'EPO des cellules érythrocytaires.

A noter que les IgA1 et la transferrine ne sont pas en compétition pour la liaison au TfR1, et que leurs actions restent additives même à des concentrations saturantes de chaque ligand.

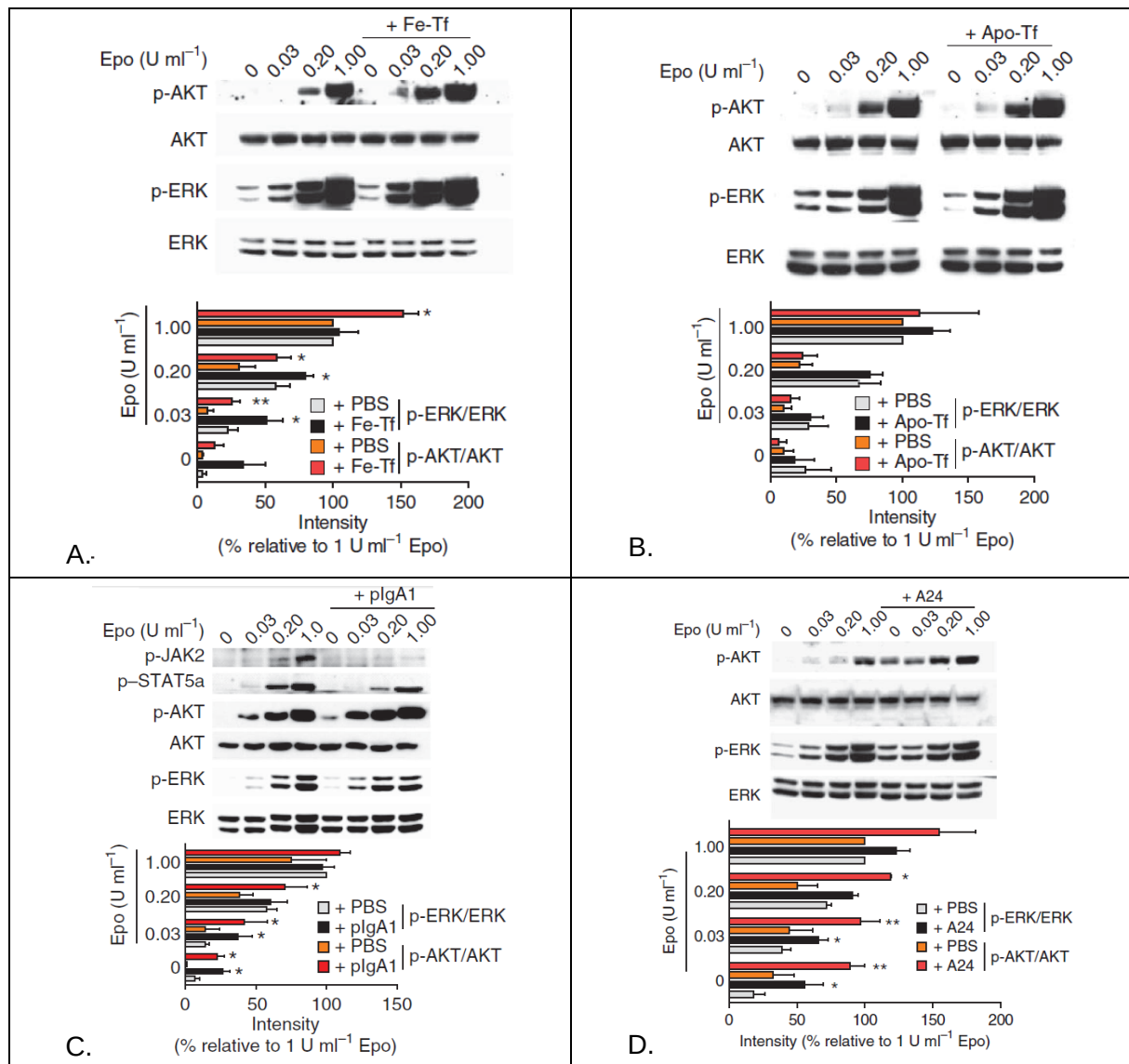


Figure 13, issue de Coulon *et al.* (Coulon *et al.* 2011). **Action des différents ligands du TfR1 sur la phosphorylation de ERK et AKT, en association avec l'EPO.**

Phosphorylation de AKT et ERK1/2 dans des cellules UT-7 déprivées en EPO pendant la nuit puis stimulées avec ou sans EPO (0,03, 0,2 et 1 U/mL), holo-transferrine (Fe-Tf, 0,2 mg/mL) (A), apo-transferrine (Apo-Tf, 0,2 mg/ml) (B), IgA polymériques (plgA) (C) ou A24 (D).

Les histogrammes montrent l'intensité de phosphorylation par rapport au signal maximal observé avec l'EPO seule.

Dans la continuité de ce travail, nous avons donc voulu savoir si la transferrine pourrait également participer à la modulation de la sensibilité à l'EPO dans l'érythropoïèse. Nous avons donc voulu explorer l'action de la transferrine sur les voies de signalisation induites par le TfR1 dans la lignée érythroïde, ainsi que la coopération éventuelle entre holo-transferrine, SCF et EPO dans ces cellules.

5.1.5. TfR1 ET SIGNALISATION EN IMMUNOLOGIE

Plusieurs arguments plaident en faveur d'un rôle du TfR1 en immunologie. Ainsi, sur les lymphocytes B et T, le TfR1 est principalement exprimé après stimulation, probablement pour aider à subvenir aux besoins en fer des cellules en division (Richardson and Ponka 1997). Une déplétion en fer induit une inhibition de la prolifération de ces lymphocytes périphériques stimulés (Seligman et al. 1991).

Par ailleurs, il a été montré que le TfR1 pouvait jouer un rôle de costimulateur dans l'activation des lymphocytes T, via la voie de signalisation du récepteur à l'interleukine 2 (IL-2R) (Cano et al. 1990, Salmeron et al. 1995). Il semble également impliqué dans la formation de la synapse immunologique et la signalisation induite par le récepteur des lymphocytes T (TCR, T-cell receptor). Réciproquement, l'activation du TCR augmente la phosphorylation du TfR (Salmeron et al. 1995).

Récemment, un lien entre une mutation du domaine intracellulaire de TfR1 au niveau du motif d'endocytose (tyrosine 20 : Y²⁰) et un déficit immunitaire a été décrit (Jabara et al. 2016). Cette tyrosine est localisée sur le motif d'endocytose du TfR1, mais nous avons montré qu'elle est également nécessaire à la fonction de signalisation du TfR1 (Coulon et al. 2011). Une mutation homozygote faux-sens substituant une histidine à cette tyrosine a été retrouvée chez trois patients issus de deux familles. Les auteurs ont démontré que cette mutation entraînait une altération de l'endocytose du fer *in vitro*. Les patients atteints présentaient un tableau de déficit immunitaire avec infections infantiles sévères et/ou récurrentes, hypogammaglobulinémie profonde, diarrhée, thrombopénie périodique et anémie microcytaire modérée dès l'enfance. Leur nombre de lymphocytes périphériques était normal, mais la prolifération des lymphocytes T des patients en réponse à divers stimuli était significativement plus faible que celle de lymphocytes T de donneurs sains. On retrouvait également un déficit en lymphocytes B mémoires, avec une diminution de leur capacité à produire des anticorps et une altération de la commutation isotypique des immunoglobulines. En réponse à la carence en fer cellulaire, l'expression du TfR1 était très augmentée à la surface des lymphocytes et des fibroblastes des patients, et le défaut de fonction des lymphocytes pouvait être récupéré *in vitro* par une supplémentation en fer (Jabara et al. 2016). Le défaut d'internalisation du TfR1 entraînait également une carence martiale au sein des érythroblastes, pourtant les patients ne présentaient qu'une anémie modérée. Ceci peut peut-être être expliqué par le rôle de STEAP3 (Six-

Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 3), une métalloprotéase capable de se lier au TfR1 et contenant un motif d'internalisation. Il est possible que le complexe TfR1/STEAP3 puisse être internalisé grâce à STEAP3, permettant ainsi l'entrée du fer dans les cellules. STEAP3 étant fortement exprimée par les érythroblastes, mais non par les lymphocytes, ceci expliquerait la survenue d'une immunodépression sans anémie grave (Lo 2016, Kawabata 2019).

S'il a été démontré que cette mutation entraînait une altération de l'endocytose du fer, son impact sur la signalisation du TfR1 n'a pas été étudié. Globalement, l'impact de la signalisation induite par le TfR1 dans les lymphocytes T est encore mal connu, même si des études ont suggéré une implication du TfR1 dans la voie de signalisation du récepteur à l'IL-2 (Cano et al. 1990, Salmeron et al. 1995).

Le récepteur à l'IL-2 de haute affinité (IL-2R) est crucial pour l'activation des cellules T. Tout comme l'EPO-R, l'IL-2R est un membre de la super-famille des récepteurs de cytokines. Alors que l'EPO et l'IL-2 stimulent la prolifération de différents types de cellules, érythroïdes et lymphocytaires T respectivement, elles induisent des réponses intracellulaires similaires telles que l'activation de STAT5, PI3K/AKT et MAPK/ERK ainsi que l'expression des protéines C-fos, C-myc et Pim-I (Lilly et al. 1992, Maslinski et al. 1992, Torti et al. 1992, Beadling et al. 1993, Miura et al. 1994). Il a été montré que l'IL-2 et l'EPO, via leurs récepteurs, activent les mêmes voies de signalisation dans une lignée de lymphocytes T (Wakao et al. 1995). En outre, l'EPO-R possède un domaine cytoplasmique critique pour la signalisation, qui est similaire à la région riche en sérine de IL-2R β (D'Andrea et al. 1989).

Parallèlement à nos travaux sur la lignée rouge, nous avons donc voulu explorer l'action de la transferrine sur les voies de signalisation induites par l'IL-2R dans une lignée de lymphocytes T, ainsi que la coopération éventuelle entre la transferrine et l'IL-2 dans ces cellules.

5.2. AUTRES FONCTIONS DU TfR2 – ERYTHROPOÏÈSE

5.2.1. MUTATIONS DU TfR2

Comme nous l'avons vu plus haut, le principal rôle du TfR2 est de participer à la régulation de la production d'hépcidine. Cette observation est confirmée par le fait que des mutations du TfR2, chez l'homme comme chez la souris, entraînent une hémochromatose – une maladie caractérisée par une surcharge en fer en lien avec une absorption accrue du fer malgré un fer élevé (circulant ou stocké sous forme de ferritine), associée à des taux d'hépcidine anormalement bas (Fleming et al. 2002, Kawabata et al. 2005, Nemeth et al. 2005, Wallace et al. 2005, Wallace et al. 2007). La surcharge en fer chronique observée dans l'hémochromatose se complique de dépôts de fer dans les tissus, entraînant des toxicités notamment cardiaques, hépatiques jusqu'à la cirrhose, endocriniennes comme le diabète, et articulaires. Dans un modèle murin, une inactivation spécifique du TfR2 dans le foie entraîne exactement le même phénotype que les souris déficientes en TfR2 dans tout l'organisme : une surcharge martiale associée à une diminution de la production d'hépcidine (Wallace et al. 2007). Ceci suggère que le foie est le site majeur de fonction du TfR2.

De plus, les souris déficientes en TfR2 ainsi que les patients atteints d'hémochromatose par mutation de TfR2 ne présentent pas d'érythropoïèse défectueuse (Camaschella et al. 2000, Fleming et al. 2002).

5.2.2. FONCTION ERYTHROÏDE DU TfR2

Ainsi, même s'il a été montré que le TfR2 était fortement exprimé par les précurseurs érythroïdes (Kawabata et al. 2001, Deaglio et al. 2002), son rôle dans l'érythropoïèse n'avait pas, jusqu'à récemment, suscité beaucoup d'attention. Plusieurs études ont pourtant identifié des polymorphismes du TfR2 affectant certains paramètres hématologiques et notamment le nombre de globules rouges (Soranzo et al. 2009, Auer et al. 2014). Puis le TfR2 a été identifié comme un partenaire de l'EPO-R, et il a été montré que le TfR2 et l'EPO-R étaient co-exprimés pendant la différenciation érythroïde (Forejtnikova et al. 2010). En effet, les niveaux d'ARN messager du TfR2 augmentent entre les stades BFU-E et CFU-E (Li et al. 2014), puis l'expression du TfR2 suit celle de l'EPO-R pendant toute la différenciation terminale (Forejtnikova et al. 2010). L'association entre TfR2 et EPO-R survient dans le réticulum endoplasmique, pendant la maturation de ces deux protéines. La maturation de l'EPO-

R est un processus relativement inefficace, aboutissant à l'accumulation de récepteurs dans le réticulum endoplasmique (Hilton et al. 1995). Il a été montré que l'association du TfR2 à l'EPO-R facilite sa maturation, et est essentiel pour un transport efficace de l'EPO-R à la surface cellulaire, augmentant ainsi son expression à la surface (Forejtnikova et al. 2010).

Ceci suggère un rôle plutôt bénéfique du TfR2 sur l'érythropoïèse, mais les différentes études actuelles sur le rôle érythroïde du TfR2 retrouvent des résultats variables.

Hypothèse n°1 : le TfR2 est un frein pour l'érythropoïèse et diminue la sensibilité des érythroblastes à l'EPO.

Il a été montré qu'en l'absence de carence martiale, les souris déficientes en TfR2 à l'échelle de l'organisme (TfR2^{KO} ou TfR2^{-/-}) ont une hémoglobine élevée, que n'ont pas les souris déficientes en TfR2 uniquement au niveau du foie (Roetto et al. 2010, Nai et al. 2014). Dans un contexte de carence martiale par surexpression d'hépcidine, ces souris TfR2^{-/-} présentent une érythrocytose associée à une microcytose marquée, ce qui n'est pas le cas des souris déficientes en TfR2 uniquement au niveau du foie (Nai et al. 2014). Ces souris, qui ont le même degré d'anémie, ont également le même taux d'EPO sérique, ce qui suggère que l'érythrocytose ne serait pas due à une augmentation du taux d'EPO mais à une augmentation de la sensibilité à l'EPO des précurseurs érythroïdes dépourvus de TfR2 (Nai et al. 2014).

Plus récemment, pour mieux explorer la fonction érythropoïétique du TfR2, Nai et al. ont développé des souris KO pour le TfR2 uniquement au niveau de la moelle osseuse. Ces souris, obtenues par transplantation de moelle de souris TfR2^{-/-} dans des souris sauvages (WT, wild type) irradiées, présentent une augmentation du nombre de globules rouges et du taux d'hémoglobine dans les 2 à 4 mois suivant la transplantation de moelle osseuse (Nai et al. 2015). Ceci s'accompagne d'une diminution du volume globulaire moyen (VGM) et de la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH), ce que l'on retrouve aussi lors d'une adaptation à une carence en fer. Ces souris présentent une augmentation de l'érythropoïèse terminale par diminution de l'apoptose des érythroblastes basophiles, polychromatophiles et acidophiles, des réticulocytes et des globules rouges (Artuso et al. 2018). Cependant, contrairement à ce que l'on observe en cas de carence martiale, cette situation n'est

pas accompagnée par une augmentation des taux d'EPO sérique, suggérant encore une fois que l'absence du TfR2 sur les progéniteurs érythroïdes augmente leur sensibilité à l'EPO. Ceci est confirmé par l'induction de gènes cibles de l'EPO, dont l'érythroferrone, chez les souris déficientes en TfR2 au niveau de la moelle (Artuso et al. 2018).

L'érythroferrone (ERFE) est une hormone récemment découverte, produite par les érythroblastes en réponse à l'EPO et capable de supprimer l'expression de l'hépcidine (Kautz et al. 2014). Elle est principalement produite en cas d'érythropoïèse de stress, pour augmenter l'apport en fer. ERFE pourrait être impliquée dans l'interconnexion des fonctions hépatiques et érythroïdes du TfR2.

Dans l'hypothèse que la perte du TfR2 au niveau érythroïde pourrait être bénéfique dans un contexte d'anémie chronique, l'inactivation du TfR2 au niveau de la moelle osseuse a ensuite été appliquée à un modèle de souris thalassémiques $Hbb^{th3/+}$, qui récapitule le phénotype d'une bêta-thalassémie intermédiaire chez l'homme (Artuso et al. 2018). Dans ce modèle, la déficience en TfR2 améliore effectivement l'anémie et la surcharge martiale des souris. Globalement, ces études montrent que le TfR2, dans la moelle, n'a pas d'impact notable sur l'homéostasie du fer, suggérant deux rôles différents pour le TfR2 (Nai et al. 2015).

Un premier modèle hypothétique sur les fonctions hépatiques et érythroïdes pourrait donc être le suivant (**Figure 14**) : en condition de forte saturation de la transferrine, le TfR2 hépatique favoriserait l'expression de l'hépcidine, qui diminue les quantités de fer sérique, tandis que le TfR2 érythroïde diminuerait la sensibilité des progéniteurs érythroïdes à l'EPO pour limiter une érythropoïèse excessive. En cas de carence martiale, le TfR2 hépatique serait dégradé, ce qui diminuerait l'expression de l'hépcidine, tandis que la dégradation du TfR2 érythroïde restaurerait la sensibilité des progéniteurs érythroïdes à l'EPO pour stimuler l'érythropoïèse. Cette érythropoïèse de stress favoriserait l'expression d'ERFE qui contribue à l'inhibition de l'hépcidine, afin d'augmenter le fer sérique nécessaire à l'érythropoïèse.

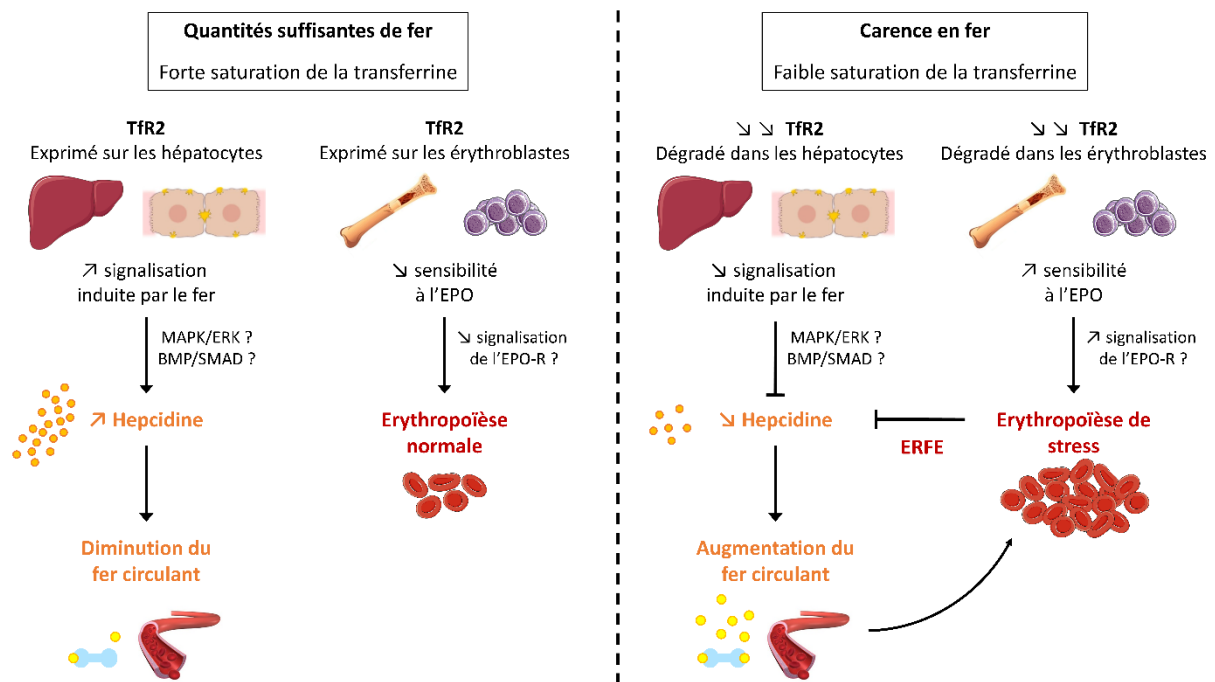


Figure 14. Modèle hypothétique des fonctions hépatiques et érythroïdes du Tfr2, d'après (Pantopoulos 2015).

Hypothèse n°2 : le Tfr2 est nécessaire à une érythropoïèse efficace et augmente la sensibilité des érythroblastes à l'EPO.

D'autres études suggèrent une hypothèse inverse concernant le rôle érythroïde du Tfr2.

En effet, dans l'étude de Forejtnikova *et al.*, les progéniteurs érythroïdes des souris Tfr2^{-/-} présentent une diminution de la sensibilité à l'EPO, corrigée par une augmentation des taux d'EPO sérique (Forejtnikova *et al.* 2010). L'inactivation (knock-down) *in vitro* du Tfr2 dans des précurseurs érythroïdes humains retarde la différenciation terminale des précurseurs érythroïdes (Forejtnikova *et al.* 2010), indiquant donc que le Tfr2 semble nécessaire à une érythropoïèse efficace.

De même, Rishi *et al.* ont démontré, dans un modèle murin déficient en Tfr2 spécifiquement dans le compartiment hématopoïétique, que le Tfr2 érythroïde était essentiel pour une réponse érythropoïétique adaptée en cas d'anémie par carence martiale (Rishi *et al.* 2016). En dehors de toute carence, les souris Tfr2^{-/-} dans la moelle avaient un taux d'hémoglobine, un volume globulaire total et un nombre de globules rouges légèrement diminués par rapport aux souris WT. En cas de régime pauvre en fer administré depuis la naissance, ces valeurs étaient comme attendu basses chez toutes les souris, mais les souris Tfr2^{-/-} présentaient une accumulation

de progéniteurs érythroïdes immatures dans la moelle et la rate, suggérant un défaut de différenciation des érythroblastes.

Dans un autre modèle murin, où l'anémie a été obtenue par inactivation du gène *Tmprss6* (aussi appelé matriptase-2 ou MT-2) qui régule négativement l'hepcidine, les auteurs ont également observé un défaut de maturation érythroïde terminale en l'absence de TfR2 (Wallace et al. 2015).

Dans un modèle de souris TfR2^{-/-} dans lequel le KO n'est pas restreint à l'hématopoïèse, les souris développent une dysérythropoïèse avec accumulation de progéniteurs érythroïdes immatures dans la moelle associée à une augmentation de l'apoptose (Pellegrino et al. 2017). Cependant, ces souris présentent également une surcharge martiale, ce qui peut directement participer à cette dysérythropoïèse.

Globalement, le rôle exact du TfR2 dans l'érythropoïèse n'est donc pas encore parfaitement déterminé, puisqu'il semble que les effets observés en présence ou en l'absence de TfR2 soient dépendants du modèle. Cependant, toutes ces études s'accordent à dire que le TfR2 a bien un rôle dans l'érythropoïèse indépendant de son rôle dans l'homéostasie du fer, qu'il semble agir au moment l'érythropoïèse terminale en coopération avec l'EPO, et que sa fonction est modulée par le statut en fer.

5.2.3. TfR2 ET SIGNALISATION DE L'EPO-R

Ainsi, le TfR2 pourrait être un modulateur de l'érythropoïèse, en limitant la sensibilité à l'EPO des précurseurs érythroïdes pour éviter une production excessive. Le TfR2 étant un partenaire de l'EPO-R, cette régulation pourrait passer par un contrôle de la signalisation de l'EPO-R.

En effet, dans les modèles développés par Nai *et al*, les souris déficientes en TfR2 au niveau de la moelle présentent une augmentation de l'expression des gènes cibles de l'EPO, suggérant une augmentation de la signalisation induite par l'EPO-R impliquant notamment les voies STAT5 et PI3K/AKT (Nai et al. 2015, Artuso et al. 2018). Cependant, l'effet direct du TfR2 sur la signalisation érythroïde a peu été étudié. Nous avons donc voulu évaluer l'impact du TfR2 sur la signalisation de l'EPO-R dans les précurseurs érythroïdes.

6. PHYTOESTROGENES ET CURCUMA COMOSA

6.1. RAPPELS SUR LES ŒSTROGENES

6.1.1. PRODUCTION ET FONCTION DES ŒSTROGENES

Les œstrogènes sont des hormones sexuelles féminines, de la famille des stéroïdes naturels. Les quatre œstrogènes naturels sont l'œstrone (E1), l'œstradiol ou 17 β -œstradiol (E2), l'œstriole (E3) et l'œstetrole (E4). L'œstradiol (E2) est considéré comme l'œstrogène majoritaire. L'œstriole (E3) et l'œstetrole (E4) sont synthétisés principalement au cours de la grossesse, E3 par le placenta et E4 par le foie du fœtus. L'œstrone (E1) est produit en quantité beaucoup moins importante que l'œstradiol (E2), ses taux augmentent surtout pendant la ménopause, et il a une affinité plus faible pour les récepteurs aux œstrogènes (Kuiper et al. 1997).

Les œstrogènes sont principalement produits par les follicules ovariens et le placenta, mais peuvent également être produits en petites quantités par de nombreux autres tissus (Gruber et al. 2002). Ils sont synthétisés à partir du cholestérol, et sont issus de réactions catalysées par des enzymes appelées aromatasases, à partir d'androgènes (**Figure 15**) – les androgènes étant les hormones sexuelles masculines.

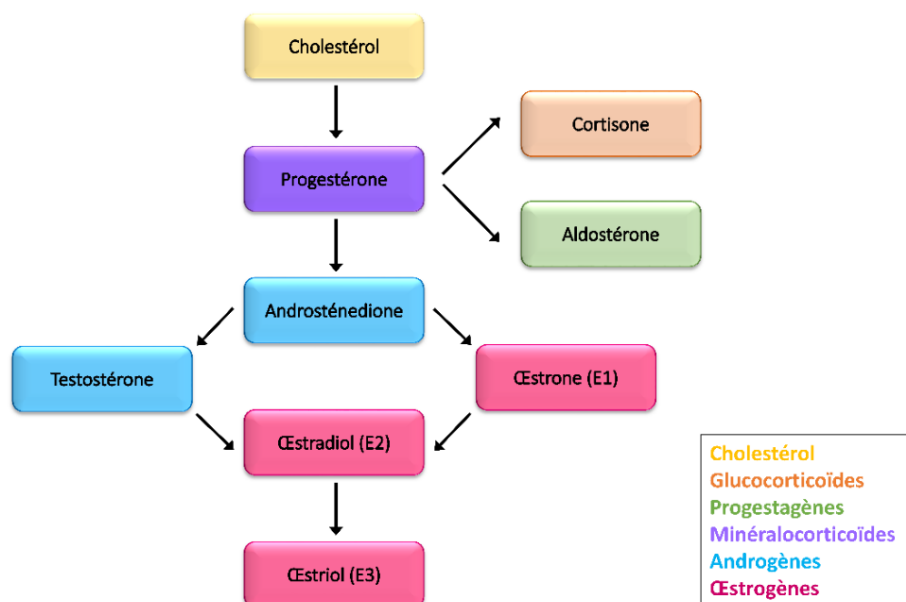


Figure 15. Schéma simplifié de la synthèse des principaux œstrogènes.

Une fois synthétisés, les œstrogènes rejoignent la circulation sanguine pour aller agir sur leurs tissus cibles. Parmi ces tissus cibles, on retrouve les glandes mammaires,

les ovaires, l'utérus, les testicules, la prostate et l'épididyme. Cependant, de nombreux autres tissus expriment les récepteurs aux œstrogènes au sein de l'organisme, et notamment les os, les poumons, le cœur, le foie, les reins, le système digestif, le système nerveux et l'hypophyse (Couse and Korach 1999, Nilsson et al. 2001, Pearce and Jordan 2004).

Les œstrogènes sont présents chez l'homme (Gooren and Toorians 2003) comme chez la femme, même s'ils sont retrouvés en général en beaucoup plus grande quantité chez la femme. Ils sont essentiels pour le développement des caractères sexuels secondaires, le contrôle du cycle menstruel chez la femme, ainsi que la reproduction. Cependant, l'expression diffuse de leurs récepteurs suggère que les œstrogènes exercent de nombreuses autres fonctions : ils sont en effet impliqués notamment dans le maintien de la densité osseuse, la protection contre l'hypercholestérolémie et les maladies cardio-vasculaires, ainsi que la neuroprotection (Couse and Korach 1999, Pearce and Jordan 2004, Heldring et al. 2007).

L'inactivation d'un ou plusieurs récepteurs aux œstrogènes par KO dans des modèles murins a montré que l'absence de ces récepteurs est viable, et ne semble pas provoquer de phénotype externe anormal notable (Lubahn et al. 1993, Krege et al. 1998). Ces récepteurs ont néanmoins un rôle important dans la morphogenèse de l'utérus, des ovaires, de la glande mammaire, de la prostate mais aussi du cerveau (Heldring et al. 2007).

6.1.2. RECEPTEURS AUX ŒSTROGENES

Les œstrogènes agissent via une liaison à deux récepteurs distincts : le récepteur aux œstrogènes alpha (ER- α) et le récepteur aux œstrogènes bêta (ER- β). Un récepteur alternatif a également été décrit, un récepteur couplé aux protéines G appelé GPR30 puis GPER (G-protein coupled estrogen receptor) (Carmeci et al. 1997), mais dont le rôle est un peu plus controversé.

Les récepteurs ER- α et ER- β sont tous les deux des protéines intra-cellulaires et font partie de la famille des récepteurs nucléaires. Dans la famille des récepteurs nucléaires, on trouve aussi les autres récepteurs stéroïdes comme les récepteurs aux androgènes, à la progestérone, aux glucocorticoïdes et aux minéralocorticoïdes, mais aussi les récepteurs de la vitamine D, de l'acide rétinoïque, ou des hormones thyroïdiennes.

Les effets des œstrogènes après liaison avec leurs récepteurs sont de deux ordres : génomiques et non génomiques. Les effets génomiques résultent de la liaison des récepteurs aux œstrogènes sur l'ADN après translocation dans le noyau. Les récepteurs agissent ici comme des facteurs de transcription, la voie classique étant dépendante de la liaison au ligand. Dans la voie non génomique, qui implique principalement ER- α , ce dernier est localisé près de la membrane plasmique, et sa liaison à l'œstradiol va activer des cascades de signalisation – dont les voies PI3K/AKT et MAPK/ERK (Le Romancer et al. 2011) (**Figure 16**). Quel que soit le mécanisme d'action, les récepteurs aux œstrogènes stimulent la prolifération et la survie cellulaire.

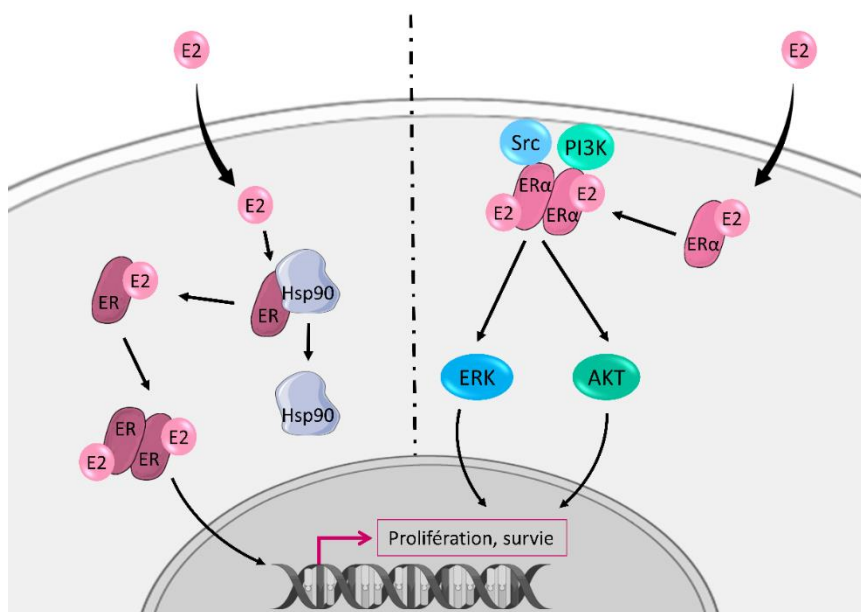


Figure 16. Représentation simplifiée des effets génomiques (à gauche) et non génomiques (à droite) des récepteurs aux œstrogènes, d'après (Le Romancer et al. 2011).

ER : récepteur aux œstrogènes, ER- α : récepteur aux œstrogènes alpha, E2 : œstradiol, Hsp90 : heat shock protein 90 (protéine chaperonne).

Voie génomique classique (transcription des gènes) : le récepteur aux œstrogènes (α ou β) est lié à la protéine chaperonne Hsp90 dans le cytoplasme en l'absence d'E2. La liaison de E2 à son récepteur va entraîner une modification de conformation du récepteur facilitant sa dissociation de Hsp90, sa dimérisation, et sa translocation dans le noyau pour agir comme facteur de transcription en se liant à l'ADN via un élément de réponse aux œstrogènes.

Voie non génomique (transduction du signal) : un petit stock de ER- α situé près de la membrane va, après liaison à E2 et dimérisation, recruter des protéines kinases (Src et PI3K) et activer des voies de signalisation (ERK, AKT).

Les récepteurs aux œstrogènes ont d'autres ligands, et notamment les SERM, les phytoestrogènes et certains perturbateurs endocriniens.

Les SERM (selective ER modulator) sont des modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes, qui peuvent fonctionner comme des agonistes ou des antagonistes selon les gènes et les tissus (Dutertre and Smith 2000). Par exemple, le tamoxifène a un effet anti-œstrogène sur le tissu mammaire normal ou tumoral, mais un effet œstrogénique sur d'autres tissus et notamment l'endomètre et l'os. Il est utilisé dans le traitement du cancer du sein, et présente comme bénéfice secondaire un effet préventif sur la perte osseuse post-ménopausique.

Des perturbateurs endocriniens retrouvés dans l'alimentation ou l'environnement, comme le bisphénol A, peuvent également se lier aux récepteurs aux œstrogènes (Delfosse et al. 2014). Leurs effets peuvent aussi différer selon les tissus : agonistes, avec une action similaire à celle des œstrogènes par mimétisme, ou antagonistes, en se fixant aux récepteurs sans les activer.

Comme nous le verrons plus loin, les phytoestrogènes ont aussi la capacité de se lier aux récepteurs aux œstrogènes, et agissent en général comme des agonistes – ils ont donc plutôt une action pro-œstrogénique.

6.2. ŒSTROGENES ET ERYTHROPOÏÈSE

6.2.1. ŒSTROGENES ET HEMATOPOÏÈSE

Connaissant le rôle majeur des hormones en général dans la régulation de l'hématopoïèse, plusieurs études se sont intéressées au rôle des œstrogènes dans ce contexte.

Les œstrogènes sont connus pour avoir un effet bénéfique sur la masse osseuse (Nakamura et al. 2007, Imai et al. 2009), et donc également sur la niche hématopoïétique située au sein des os (Dai et al. 2007, Fan et al. 2014, Gao et al. 2015). Lorsqu'ils se sont avérés également favorables à l'hématopoïèse, il a été suggéré que cet avantage pourrait être lié uniquement à l'amélioration de la niche (Qiu et al. 2012). Finalement, il a été démontré que les œstrogènes avaient un impact sur les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques indépendamment de leur effet sur le système osseux (Illing et al. 2012).

De plus en plus de données montrent que les œstrogènes semblent en effet avoir

un rôle important dans l'hématopoïèse. Ce rôle est suggéré depuis longtemps, mais le mécanisme n'est pas encore parfaitement compris et les études sont parfois discordantes. D'après les différentes données disponibles, et de façon non exhaustive, les œstrogènes stimuleraient la granulopoïèse (Reisner 1966), la mégacaryopoïèse (Bord et al. 2000) et la différenciation en cellules dendritiques (Paharkova-Vatchkova et al. 2004), réguleraient négativement la lymphopoïèse B (Medina and Kincade 1994, Medina et al. 2000, Medina et al. 2001), perturberaient la distribution des sous-populations B (Grimaldi et al. 2001) mais stimuleraient la production d'anticorps (Butterworth et al. 1967, Erlandsson et al. 2002), et altèreraient la lymphopoïèse T en induisant une atrophie thymique (Phuc et al. 1981, Zoller and Kersh 2006) et une modification de la répartition des sous-populations lymphocytaires (Okasha et al. 2001) et des réponses lymphocytaires T (Maret et al. 2003, Gourdy et al. 2005) – modifiant ainsi les réponses immunes (Fish 2008, Ghazeeri et al. 2011).

Une carence en œstrogènes induite par ovariectomie chez le rat entraîne une diminution de volume du tissu hématopoïétique (Lei et al. 2009). Globalement, la présence d'œstrogènes paraît nécessaire pour une hématopoïèse normale (Qiu et al. 2012).

Il avait déjà été montré que les œstrogènes, ou la progestérone, pouvaient agir sur les cellules souches mammaires en induisant à la fois une augmentation du nombre de ces cellules souches et leur différenciation (Asselin-Labat et al. 2010, Joshi et al. 2010), et ce, malgré l'absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes classiques par les cellules souches mammaires. Cette action semblait donc soit nécessiter un récepteur alternatif, soit être indirecte, impliquant notamment la niche des cellules souches mammaires (Joshi et al. 2010).

Dans la moelle osseuse, l'action des œstrogènes semble directe, médiée par le récepteur ER- α (Thurmond et al. 2000, Maret et al. 2003). Celui-ci est présent sur des cellules matures, mais également sur des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes (Thurmond et al. 2000, Igarashi et al. 2001, Carreras et al. 2008). Plus récemment, il a été démontré que le récepteur ER- α était exprimé par les cellules souches hématopoïétiques et qu'un traitement par œstradiol favorisait la multiplication et la différenciation de ces cellules souches, chez les souris mâles comme femelles (Nakada et al. 2014). Dans une autre étude, l'activation d'ER- α par le tamoxifène (un SERM), induisait l'apoptose des CSH à courte durée de vie et des progéniteurs multipotents, mais la prolifération des CSH quiescentes à longue durée de vie

(Sanchez-Aguilera et al. 2014). De façon intéressante, le tamoxifène induisait préférentiellement l'apoptose de cellules souches leucémiques, tout en n'ayant qu'un impact mineur sur l'hématopoïèse normale des souris (Sanchez-Aguilera et al. 2014).

6.2.2. ŒSTROGENES ET ERYTHROPOÏÈSE

Les œstrogènes ont longtemps été considérés comme néfastes pour l'érythropoïèse, puisqu'ils avaient tendance, à forte dose, à induire une anémie chez les mammifères (Dukes and Goldwasser 1961, Mirand and Gordon 1966). Chez les poulets, on observait une stimulation de la prolifération des progéniteurs érythroïdes, mais associée à un retard de maturation ainsi qu'à la répression de nombreux gènes érythroïdes – cette dernière semblant être un effet direct des œstrogènes (Schroeder et al. 1993).

Il a ensuite été montré que les œstrogènes réduisaient le nombre de colonies érythroïdes (BFU-E pour burst forming unit erythroid) lors de cultures primaires de moelle osseuse humaine (Blobel et al. 1995). Ceci était lié à une régulation négative de l'expression de GATA-1 par le récepteur aux œstrogènes (Blobel et al. 1995), GATA-1 étant un facteur de transcription absolument essentiel à la survie et la maturation des précurseurs érythroïdes (Zermati et al. 2001, Ribeil et al. 2007, Gutierrez et al. 2008). En se liant à son récepteur, l'œstradiol était capable d'induire l'apoptose des cellules d'une lignée érythroleucémique humaine (Blobel and Orkin 1996).

Puis Nakada *et al.* ont démontré que les cellules souches hématopoïétiques (CSH) de souris répondent favorablement aux signaux œstrogéniques (Nakada et al. 2014). Les auteurs révèlent que, en conditions basales, les CSH femelles ainsi que leurs progéniteurs directs, les progéniteurs multipotents (MPP), se divisent plus fréquemment que les CSH mâles et génèrent plus de progéniteurs érythroïdes. Malgré cette augmentation de division, les mâles et les femelles ont le même nombre de CSH à l'état basal, et la même composition en cellules dans la moelle osseuse et la rate. L'hypothèse proposée est que les CSH femelles subissent des divisions plus asymétriques que les CSH mâles, aboutissant à une production plus importante de progéniteurs érythroïdes, mais que ces derniers subissent ensuite une mort cellulaire plus importante que les progéniteurs érythroïdes mâles – aboutissant donc à un nombre équivalent de cellules érythroïdes à l'état basal. Les auteurs ont également

monté que l'administration d'œstradiol augmentait à la fois l'auto-renouvellement et la différenciation érythroïde des CSH mâles comme femelles (Nakada et al. 2014). Ainsi, pendant la grossesse, alors que les taux d'œstrogènes augmentent (Gruber et al. 2002), on observe une expansion des CSH dans la moelle osseuse et la rate, et des progéniteurs érythroïdes dans la rate. Ceci pourrait avoir pour fonction d'aider les mères à répondre aux exigences hématopoïétiques liées à la grossesse : les CSH femelles étant ainsi en permanence "prêtes" à répondre à la demande accrue de sang pendant la grossesse (Leeman and Brunet 2014) (**Figure 17**). Dans l'espèce humaine également, on observe une augmentation de la masse globulaire totale, ainsi qu'une splénomégalie, au cours de la grossesse (Maymon et al. 2006).

Les auteurs ont ensuite montré que l'effet de l'œstradiol observé dans la moelle osseuse était médié par le récepteur ER- α , entraînant l'activation de gènes liés au cycle cellulaire pour augmenter la prolifération des CSH (Carreras and Kovats 2014, Nakada et al. 2014). Les CSH mâles expriment également ce récepteur ER- α , expliquant que la réponse à l'œstradiol soit la même dans les CSH mâles ou femelles (Calvanese et al. 2014, Nakada et al. 2014). Cette prolifération des CSH était réduite en cas d'ovariectomie (les ovaires étant le principal lieu de production des œstrogènes), d'inactivation de ER- α , ou de traitement par inhibiteur de l'aromatase (l'aromatase étant l'enzyme nécessaire à la conversion des androgènes en œstrogènes) (Nakada et al. 2014).

Une autre étude a permis de valider ces données dans des cellules humaines. En effet, sur des cellules souches pluripotentes induites ou des cellules issues de sang de cordon, l'œstradiol augmente également le nombre de cellules souches et de progéniteurs hématopoïétiques, puis d'érythrocytes (Kim et al. 2016). Cet effet est dépendant du récepteur ER- α , confirmant donc l'importance des œstrogènes et de la voie du récepteur ER- α dans l'hématopoïèse humaine.

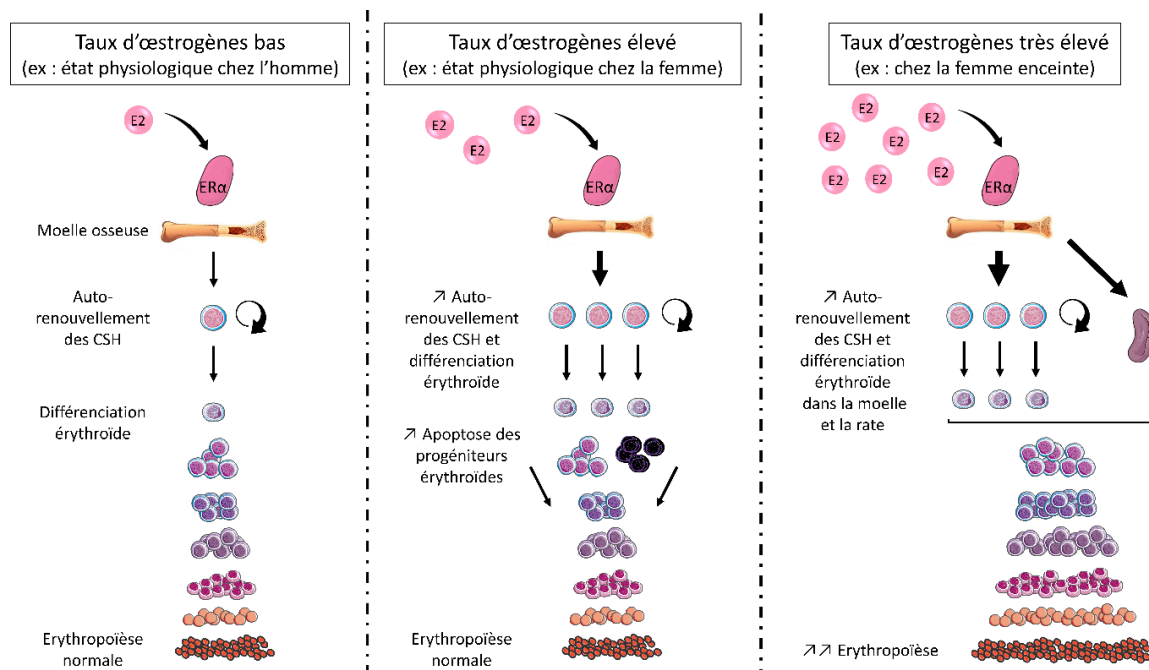


Figure 17. Représentation du rôle des œstrogènes dans la régulation de l'érythropoïèse, d'après (Nakada et al. 2014) et (Leeman and Brunet 2014).

6.3. LIMITES DE L'UTILISATION THERAPEUTIQUE DES ŒSTROGENES

6.3.1. BENEFICES ET UTILISATIONS DES ŒSTROGENES

Comme mentionné plus haut, les œstrogènes sont engagés dans de nombreux aspects de la santé féminine, mais également masculine. En dehors de leurs fonctions sur le système génital, ils ont de nombreux bénéfices sur le métabolisme du glucose et des lipides et la prévention des maladies cardio-vasculaires, la régulation de la réponse à l'insuline, le maintien de la masse osseuse, ou encore le maintien de la fonction cognitive (Couse and Korach 1999, Pearce and Jordan 2004, Heldring et al. 2007).

Le métabolisme des œstrogènes peut donc être ciblé dans plusieurs situations. Ainsi, un traitement par œstrogène peut être utilisé en supplémentation dans l'hypogonadisme féminin, dans des situations de carence en œstrogènes, d'aménorrhée primaire ou secondaire et dans certains cas d'infertilité, comme contraceptif oral, ou encore dans le traitement des symptômes de la ménopause et la prévention de l'ostéoporose post-ménopausique. Certains cancers hormono-dépendants bénéficient également d'un traitement soit œstrogénique, soit anti-œstrogénique – l'effet des œstrogènes comme des anti-estrogènes pouvant varier selon le tissu et/ou le récepteur.

6.3.2. EFFETS NEGATIFS DES ŒSTROGENES ENDOGENES OU EXOGENES

Par ailleurs, bien que les œstrogènes soient essentiels à la physiologie humaine normale, ils peuvent avoir des effets indésirables sévères lorsqu'ils sont retrouvés à forte dose – notamment en cas d'utilisation thérapeutique. En particulier, de nombreuses études ont retrouvé une association entre les œstrogènes et le développement et/ou la progression de divers types de cancers, notamment le cancer du sein, de l'endomètre ou des ovaires chez la femme, le cancer de la prostate chez l'homme, ou encore les cancers du poumon et du colon (Clemons and Goss 2001, Prentice and Anderson 2008, Folkerd and Dowsett 2010, Nelles et al. 2011, Liang and Shang 2013). Les œstrogènes ont même été classifiés comme cancérigènes par le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) et le National Toxicity Program des Etats-Unis.

Des alternatives thérapeutiques ayant un potentiel similaire, sans augmentation de ces risques, représenteraient donc une stratégie attrayante.

6.4. PHYTOESTROGÈNES

Les phytoestrogènes sont des composés végétaux non stéroïdiens d'origine naturelle, dont la structure est très proche de celle des œstrogènes endogènes et qui exercent une activité œstrogénique (Desmawati and Sulastri 2019). Ils exercent leurs actions principalement en activant la transcription de gènes cibles spécifiques dans le noyau après leur liaison aux récepteurs aux œstrogènes, ER- α et ER- β (Kuiper et al. 1998, Kostelac et al. 2003).

Des effets pharmacologiques divers sur de nombreux tissus ont été attribués aux phytoestrogènes (Cos et al. 2003), dont un effet préventif sur le développement du cancer du sein (Fritz et al. 1998, Lamartiniere 2000), de troubles du métabolisme lipidique (Merz-Demlow et al. 2000, Hwang et al. 2001) ou d'ostéoporose chez les femmes ménopausées (Alekel et al. 2000). D'autres actions des phytoestrogènes sont indépendantes de leur liaison aux récepteurs aux œstrogènes, comme leurs effets anti-oxydants ou anti-inflammatoires (Cos et al. 2003, Ricketts et al. 2005).

Les phytoestrogènes suscitent surtout beaucoup d'intérêt en tant qu'alternatives aux œstrogènes en raison de leur profil de tolérance plus favorable, notamment pour soulager les symptômes de la ménopause.

6.5. CURCUMA COMOSA

6.5.1. DESCRIPTION DU CURCUMA COMOSA

Le curcuma appartient à la famille des Zingibéracées, une famille de plantes à fleurs regroupant environ 1600 espèces réparties en une cinquantaine de genres. Cette famille regroupe plusieurs espèces couramment utilisées comme épices ou condiments, telles que le gingembre, la cardamome ou le curcuma. L'épice que l'on connaît sous le nom de curcuma est issue de l'espèce *Curcuma longa*.

Plusieurs épices de cette famille sont connues pour avoir des propriétés médicinales : anti-émétique, anti-migraineux et aphrodisiaque pour le gingembre (Chrubasik et al. 2005), détoxifiante pour la cardamome, anti-inflammatoire et anti-cancéreuse pour le curcuma (Kocaadam and Sanlier 2017).

Le *Curcuma comosa*, de son nom complet *Curcuma comosa* Roxb, doit son nom au Dr William Roxburgh, un chirurgien et botaniste écossais connu comme le père fondateur de la botanique indienne (**Figure 18**). Il peut être trouvé en Inde et en Asie, notamment en Thaïlande, Indonésie et Malaisie.

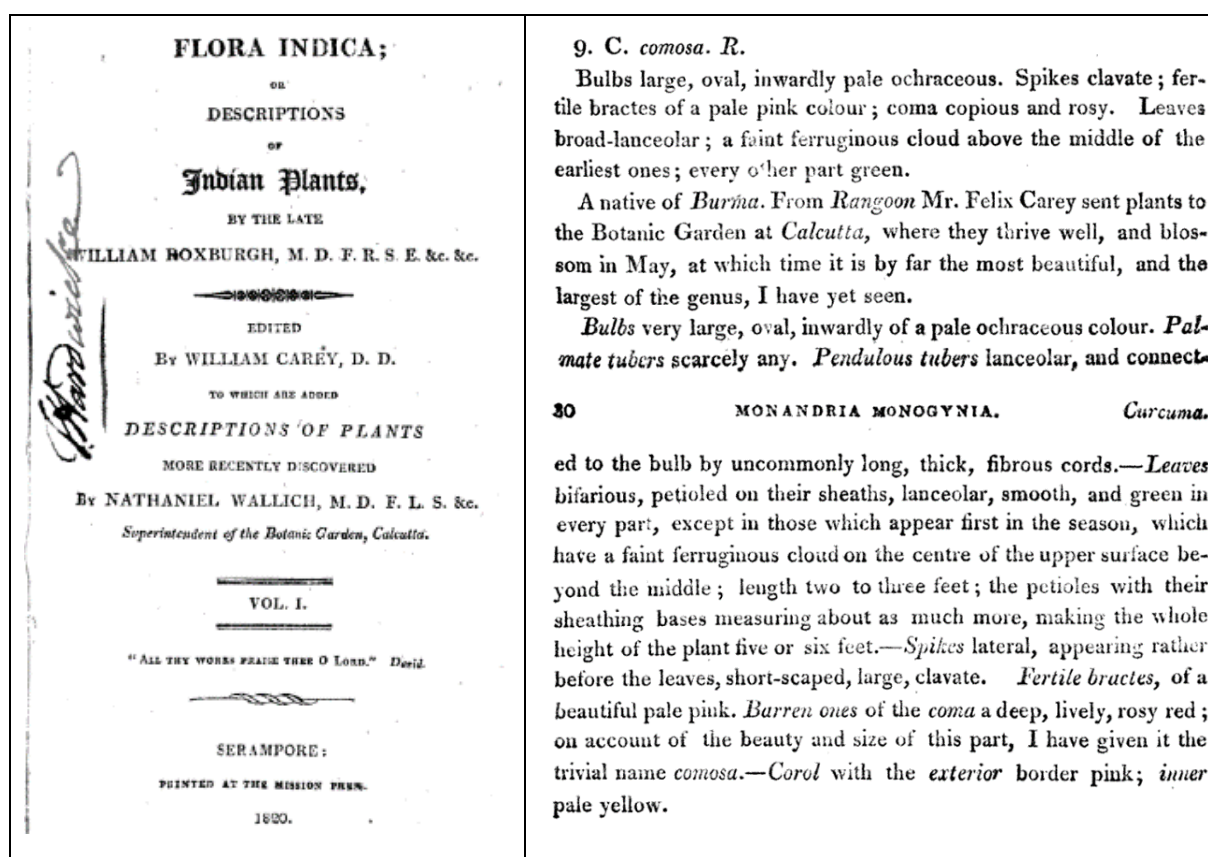




Figure 18. Description du *Curcuma comosa* par William Roxburgh en 1810 (Roxburgh 1810).

La partie du *Curcuma comosa* qui est utilisée est le rhizome, sa volumineuse tige souterraine, qui est séchée puis réduite en poudre (**Figure 19**). Cette poudre est ensuite mise à macérer pendant environ 48h dans un solvant qui peut être par exemple de l'éthanol ou de l'hexane, afin d'obtenir les extraits utilisés pour leurs vertus thérapeutiques.

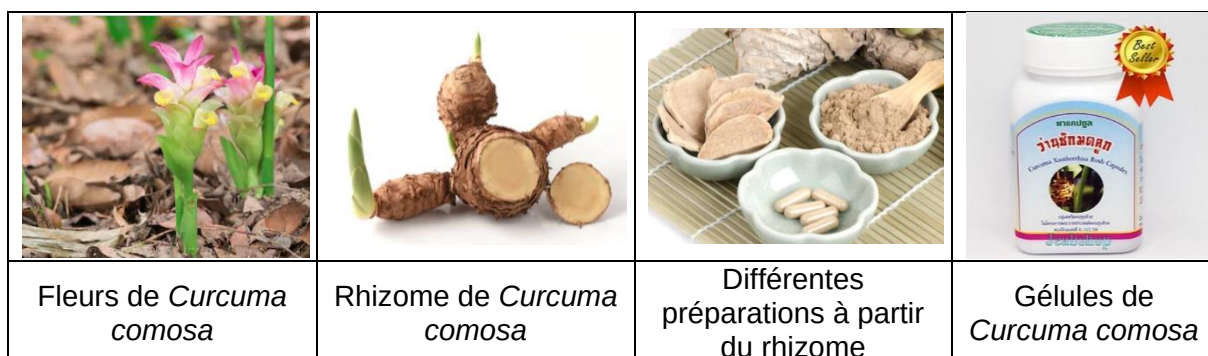


Figure 19. Plusieurs formes du *Curcuma comosa*.

6.5.2. PROPRIETES MEDICINALES DU *CURCUMA COMOSA*

Le *Curcuma comosa*, appelé Waan Chak Modluk en thaïlandais, est utilisé depuis longtemps dans la médecine traditionnelle Thaïlandaise comme traitement des saignements utérins après accouchement, et des symptômes de la ménopause, grâce à son activité œstrogénique (Piyachaturawat et al. 1995).

De nombreuses autres vertus proches de celles des œstrogènes ont été attribuées au *Curcuma comosa*, à l'un de ses extraits ou l'un de ses composants, telles que :

- Une activité sur le métabolisme lipidique des souris et des hamsters avec un effet hypolipémiant et hypocholestérolémiant (Piyachaturawat et al. 1997, Piyachaturawat et al. 1999), et prévention de l'athérosclérose chez le lapin (Charoenwanthanang et al. 2011),
- Une action anti-diabétique chez le rat avec diminution de la résistance à l'insuline (Prasannarong et al. 2012),
- Un effet vasodilatateur dépendant du récepteur aux œstrogènes et impliquant la synthèse de monoxyde d'azote (NO) chez le rat (Intapad et al. 2009, Intapad et al. 2012),
- Une action anti-inflammatoire via la diminution du relargage de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha) et l'interleukine-1 β sur une lignée de cellules microgliales de rat et des cellules mononucléées humaines (Jantaratnotai et al. 2006, Sodsai et al. 2007, Thampithak et al. 2009),
- Un effet protecteur sur le déclin de la fonction cognitive chez le rat (Su et al. 2010, Su et al. 2011),
- Une action anti-ostéoporotique chez la souris avec prévention de la perte osseuse induite par une carence en œstrogènes (Weerachayaphorn et al. 2011, Bhukhai et al. 2012),
- Un effet protecteur contre certaines lésions hépatiques induites chez la souris (Weerachayaphorn et al. 2010),
- Un effet protecteur sur la néphrotoxicité induite par la cisplatine chez la souris (Jariyawat et al. 2009),
- Une action anti-oxydante avec protection contre un stress oxydatif induit sur des cellules humaines d'épithélium pigmentaire rétinien (Jitsanong et al. 2011),
- Une action cytotoxique sur des cellules leucémiques murines (Jariyawat et al. 2011).

6.5.3. ACTIVITE ŒSTROGENIQUE DU *CURCUMA COMOSA*

Parmi les différents extraits du *Curcuma comosa*, il a été montré que l'extrait d'hexane était celui qui présentait l'activité œstrogénique la plus marquée (Piyachaturawat et al. 1995).

Un certain nombre de diarylheptanoïdes, qui sont une famille de métabolites secondaires des plantes, ont été isolés à partir du *Curcuma comosa* (Suksamrarn et al. 2008). Parmi ceux-ci, ASPP 049 ((3R)-1,7-diphenyl-(4E,6E)-4,6-heptadien-3-ol), ou ASPP 049, est le composant principal (Suksamrarn et al. 2008) et celui qui exerce la plus forte activité œstrogénique (Winuthayanon et al. 2009).

La plupart des phytoestrogènes ont été identifiés grâce à leurs similitudes fonctionnelles, mais aussi structurales, avec les œstrogènes : c'est notamment le cas pour la génistine, un phytoestrogène commun issu du soja (**Figure 20**). Bien que tous les diarylheptanoïdes issus du *Curcuma comosa* présentent une activité œstrogénique inférieure à celle du 17 β -œstradiol (E2), certains, dont ASPP 049, exercent une activité œstrogénique plus élevée que celle de la génistine – et ce malgré des différences de structure (**Figure 20**) (Suksamrarn et al. 2008).

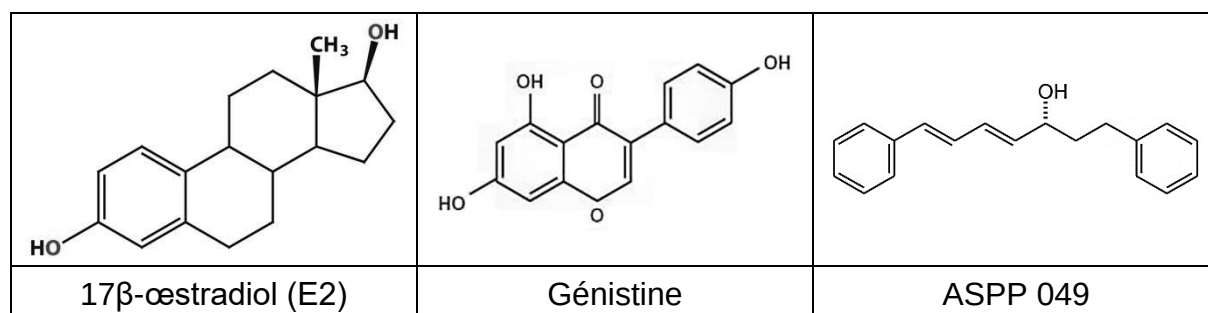


Figure 20. Structure du 17 β -œstradiol, de la génistine et du composé ASPP 049.

Traditionnellement, le *Curcuma comosa* est connu pour soulager la douleur et l'inflammation utérine post-partum, et améliorer l'involution utérine après la naissance. Il est également utilisé dans le but de renforcer les muscles vaginaux et prévenir le prolapsus du vagin, soulager les symptômes du syndrome prémenstruel et de la ménopause.

Une étude chez le rat a montré que le *Curcuma comosa* permettait une augmentation de l'épaisseur de l'épithélium utérin ainsi qu'une amélioration de la croissance et de la kératinisation de la membrane vaginale, même si ces effets étaient

moindres que ceux obtenus avec l'œstradiol (Piyachaturawat et al. 1995). Le *Curcuma comosa* permettait également de diminuer la contraction du muscle lisse utérin chez le rat (Sawasdipanich 1994).

Concernant le mécanisme d'action, le composé ASPP 049 agit via le récepteur aux œstrogènes ER- α (Winuthayanon et al. 2009). Ses effets sont abolis en présence d'un inhibiteur spécifique du récepteur aux œstrogènes, ICI 182,780 (Intapad et al. 2009).

La liaison d'ASPP 049 au récepteur ER- α augmente la phosphorylation d'AKT et active la voie de signalisation de l'oxyde nitrique synthase (NOS) aboutissant à la production de monoxyde d'azote au niveau du tissu aortique chez le rat (Intapad et al. 2009), ainsi que la voie de signalisation Wnt/bêta-caténine, qui est associée à la prolifération et la différenciation des cellules osseuses (Bhukhai et al. 2012).

L'activité du *Curcuma comosa* ou de son composant ASPP 049 sur l'érythropoïèse n'a jamais été étudiée. Etant donné l'effet bénéfique des œstrogènes sur l'érythropoïèse, nous avons voulu étudier l'action de ce phytoestrogène sur la lignée érythroïde, seul ou en coopération avec les facteurs de croissance érythropoïétiques majeurs que sont le SCF et l'EPO.

V. Justification de l'étude

L'érythropoïèse est un processus à la fois extrêmement productif et très finement régulé, afin de produire un nombre de globules rouges en permanence adapté aux besoins. A l'état physiologique, le nombre de globules rouges produits est déjà énorme puisqu'il est estimé à deux millions de globules rouges par seconde, soit 200 milliards par jour. Etant donné le rôle essentiel des globules rouges dans le transport de l'oxygène, l'organisme doit être capable d'augmenter rapidement cette production en cas de stress hématopoïétique, lorsqu'il existe une demande accrue en globules rouges – par exemple en cas d'anémie aiguë périphérique ou d'hypoxie.

Il existe donc au niveau de la moelle osseuse une réserve de progéniteurs et précurseurs érythroïdes qui peuvent proliférer et se différencier en érythrocytes matures en cas de stress, mais dont une partie va entrer en apoptose à l'état physiologique afin de ne pas entraîner de surproduction de globules rouges. Cette régulation est majoritairement médiée par le taux d'EPO. Cependant, à l'état physiologique, pour un même taux d'EPO, seule une partie des progéniteurs érythroïdes va entrer en apoptose, tandis qu'une autre partie va survivre et poursuivre sa différenciation. Ces progéniteurs sont considérés comme plus sensibles à l'EPO, puisqu'ils sont capables de répondre à de faibles concentrations d'EPO. Les facteurs qui modulent cette sensibilité des progéniteurs érythroïdes à l'EPO ne sont pas encore parfaitement connus.

En nous basant sur des travaux préliminaires réalisés au sein du laboratoire, nous avons voulu explorer le rôle de deux acteurs potentiels de cette régulation : la transferrine et ses récepteurs d'une part, un phytoestrogène et le récepteur ER- α d'autre part. Nous avons choisi d'explorer ces deux sujets par le biais de la signalisation érythroïde, en raison de données récentes issues du laboratoire et de la littérature sur la signalisation induite par le TfR1 et par l'ER- α .

Les objectifs de ce travail étaient les suivants (**Figure 21**) :

- Sachant que le TfR1 est un récepteur capable d'induire une signalisation, et qu'il est très fortement exprimé sur les érythroblastes, quel est l'impact de la transferrine sur les voies de signalisation érythroïdes ? Existe-t-il une coopération entre la transferrine et les facteurs érythroïdes essentiels que sont l'EPO et le SCF, sur l'activation de ces voies de signalisation ? Cette coopération est-elle indépendante du rôle d'endocytose du fer du TfR1 ?
- Sachant qu'il n'a jamais été trouvé d'interaction entre le TfR1 et l'EPO-R, mais qu'il existe une interaction bien démontrée entre TfR2 et EPO-R, le TfR2 a-t-il un impact sur l'activation des voies de signalisation érythroïdes ?
- Sachant que la signalisation induite par l'ER- α a un effet bénéfique sur l'érythropoïèse, et que le *Curcuma comosa* est un phytoestrogène capable de se lier à l'ER- α , le *Curcuma comosa* a-t-il un impact positif sur l'érythropoïèse, et par quel mécanisme ?

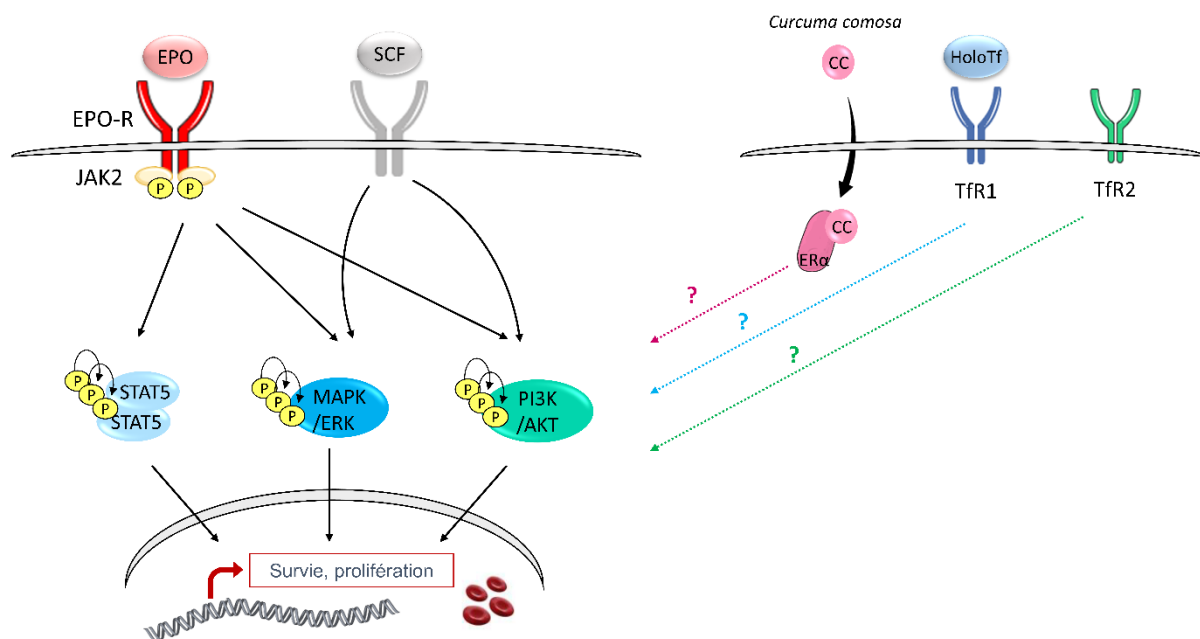


Figure 21. Résumé schématique des objectifs de ce travail.

Les éléments de réponse sont présentés ci-dessous, sous la forme de deux short reports en cours de soumission.

VI. Résultats

1. HOLO-TRANSFERRIN POTENTIATES ERYTHROPOIETIN-INDUCED ACTIVATION OF MAJOR PATHWAYS INVOLVED IN ERYTHROBLAST PROLIFERATION AND SURVIVAL

1.1. SHORT REPORT

Holo-transferrin potentiates erythropoietin-induced activation of major pathways involved in erythroblast proliferation and survival

Guillemette Fouquet^{1,2*}, Kanit Bhukhai^{1,2,3*}, Carine Lefevre^{4,5,6}, Alice Rousseau^{4,5},
Thiago T. Maciel^{1,2}, Olivier Hermine^{1,2,6,7} and Ivan C. Moura^{1,2}

Author's addresses.

1. Institut Hospitalo-Universitaire (IHU) Imagine, Université Sorbonne Paris cité, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Paris, France
2. INSERM U1163, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Hôpital Necker, Paris, France
3. Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand
4. INSERM U1016, Institut Cochin, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR8104, Paris, France
5. Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France
6. Laboratory of Excellence GReX, Paris, France
7. Service d'Hématologie clinique adultes, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Paris, France

*: GF and KB contributed equally to this work

Correspondance.

Dr. Ivan C. Moura,
INSERM-UMR1163, Institut Imagine, 24 Bd du Montparnasse, 75015 Paris, France.
Phone: 33-1-4275-4285; Fax: 33-1-4275-4217; Email: ivan.moura@inserm.fr.
Pr Olivier Hermine,
INSERM-UMR1163, Institut Imagine, 24 Bd du Montparnasse, 75015 Paris, France.
Phone: 33-1-4275-4285; Fax: 33-1-4275-4217; Email: ohermine@gmail.com.

Running title. Transferrin potentiates EPO-induced signaling in erythropoiesis.

Key words. TfR1, transferrin, erythropoiesis, signaling, EPO-R, TfR2

Words. 1194 ; **Figures.** 2 ; **Tables.** 0 ; **Supplementary figures.** 2 ; **References.** 21

Key Points.

- TfR1 is a signaling competent molecule and transferrin potentiates EPO-induced activation of major pathways involved in erythroblast proliferation and survival, independently of endocytosis.
- Loss of TfR2 increases EPO-R signaling in erythroid cells.

Introduction

Two growth factors are absolutely necessary for erythropoiesis: stem cell factor (SCF) and erythropoietin (EPO) (1, 2). Binding of EPO to the EPO receptor (EPO-R) activates three major signaling pathways: STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5), MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase) and PI3K (phosphoinositide-3-kinase)/AKT (3). The amount of circulating EPO is suboptimal (4), therefore the capacity of erythroblasts to survive depends on their sensitivity to EPO (5). Yet, the factors affecting responses to EPO during erythropoiesis remain largely unknown.

Iron, and the transferrin receptor-1 (TfR1), are also essential for erythroid precursors due to high iron requirement for hemoglobin synthesis (6, 7). Studies on TfR1 have essentially focused on its established role in iron uptake, while TfR1 is actually a multi-ligand receptor involved in many cellular functions (8-10). We recently discovered that TfR1 is a signaling-competent molecule (11). We therefore aimed to investigate whether TfR1 could act in cooperation with EPO-R signaling in erythroid cells.

Transferrin receptor-2 (TfR2), a TfR1 homologue, is known to regulate hepcidin production by hepatocytes (12), but is also expressed in erythroid cells (13, 14). The association between EPO-R and TfR1 has never been proven, however interactions between TfR1 and TfR2 have been described (15). TfR2 was also identified as a partner of EPO-R to regulate red blood cell production (13). We thus wanted to explore the role of TfR2 on EPO-R signaling.

By studying the role of both transferrin receptors, we aimed to identify new molecular mechanisms involved in EPO sensitivity in erythropoiesis.

Material and Methods

UT7/EPO stimulation. For western blot analyses, UT7/EPO cells, a human erythroid cell line dependent on EPO (16), were starved from EPO and FBS overnight and from transferrin for 4 hours using 5 μ M ferric nitrilotriacetate, then treated with EPO, SCF, Holo-transferrin and/or Apo-transferrin as indicated.

Antibodies and inhibitors. Antibodies against phospho-ERK (p44/42, Thr202/Tyr204), ERK, phospho-AKT (Ser473), AKT, phospho-STAT5 (Tyr694), STAT5 were from Cell Signaling technology. Anti-TfR1 antibody was from Life technologies, anti-TfR2 antibody was from Santa Cruz. A24, a neutralizing anti-TfR1 monoclonal antibody was produced, purified and characterized in our laboratory (17). EPO-R antibody was kindly provided by Patrick Mayeux (PAB 58B). For flow cytometry, we used a FITC-conjugated anti-human TfR1 (clone

YDJ1.2.2). Jak2 inhibitor (**ruxolitinib**) was obtained from the department of Hematology, Hôpital Necker, Paris. **Dynasore** and **MG132** were purchased from Sigma-Aldrich.

Mass spectrometry (Nanopro) analyses were performed by the proteomic platform of Cochin Institute, using antibodies against p44/42 ERK (phospho-ERK1 Thr202/204, phospho-ERK2 Thr185/Tyr187) (Cell Signaling).

Knock-out of TfR2 in UT7/EPO cells by CRISPR/Cas-9-mediated genome editing was performed by the CRISPR platform of the GR-Ex (Carine Lefevre) (Supplemental methods).

Figures and statistical analyses were performed with GraphPad Prism 7.0.

Results

Holo-Tf improves EPO-R signaling in UT7/EPO cells.

To investigate TfR1 signaling function in erythroid cells, we treated UT7/EPO cells with varying concentrations of Holo-transferrin (Holo-Tf, charged with iron), Apo-transferrin (Apo-Tf, empty of iron), EPO or SCF. We found that Holo-Tf improves EPO-induced phosphorylation of ERK and AKT (**Figure 1A**), especially at sub-optimal (physiological) concentrations of Holo-Tf (0.2 mg/mL) and EPO (0.1 U/mL) (**Figure 1B**). Using mass spectrometry, we confirmed that Holo-Tf potentiates EPO-induced phosphorylation of ERK1/2, even at supra-physiological concentrations of EPO (1 U/mL) (**Figure 1C**). This increase in ERK and AKT phosphorylation is maintained at various stimulation times (**Figure 1D**).

As compared with Holo-Tf, Apo-Tf has a lesser effect on EPO-induced ERK and AKT phosphorylation (**Figure 1E**). Holo-Tf does not have any effect on SCF-induced phosphorylation of ERK and AKT (**Figure 1F**).

Holo-Tf also potentiates EPO-induced STAT5 phosphorylation, at various stimulation times (**Figure 1G**). JAK2 inhibition prevents the cooperation between Holo-Tf and EPO on STAT5, ERK and AKT phosphorylation (**Figure 1H**).

To verify that Holo-Tf effect was independent of iron entry through TfR1 endocytosis, we treated the cells with dynasore, a GTPase potent inhibitor of endocytosis (18). We observed that our A24 antibody triggers TfR1 endocytosis and prevents its recycling, inducing a decrease in TfR1 surface expression (**Figure 1I**). By flow cytometry, we validated that dynasore blocks TfR1 endocytosis at high concentration (80 μ M) (**Figure 1I**). We then further confirmed that Holo-Tf potentiates EPO-induced phosphorylation of ERK, AKT and STAT5 independently of endocytosis, even though we observed a decreased global activation (**Figure 1I**).

Afterwards, we found that Holo-Tf could also potentiate IL2-induced phosphorylation of AKT, ERK and STAT5 in T-lymphocytes (KIT225 cell line), independently of endocytosis

(**Supplemental Figure S1**). These data suggest that TfR1 triggering by Holo-Tf could potentiate other cytokine-induced pathways in different cell types.

Knock-out of TFR2 improves EPO-R signaling, but abrogates the effect of Holo-Tf, in UT7/EPO cells.

As no interaction was ever found between EPO-R and TfR1, we performed a knock-out (KO) of TfR2 using the CRISPR/Cas9 technology in UT7/EPO cells (**Supplemental Figure S2A**) to study the impact of TfR2 in erythroid cells (19).

In TfR2-KO UT7 cells, we observed an increased ERK, AKT and STAT5 phosphorylation with low concentrations of EPO as compared to WT cells, but no impact of Holo-Tf as compared to EPO alone (**Figures 2A, Supplemental Figure S2B**). This increase in phosphorylation was supported by increase in EPO-R protein expression (**Figure 2B**). In agreement with the idea that the increase of EPO-sensitivity induced by holo-Tf (**Figure 1**) could involve a variation of EPO-R expression, we observed an increase in EPO-R expression with increasing concentrations of Holo-Tf in WT UT7 cells (**Figure 2C**). This increase in EPO-R with Holo-Tf treatment was reduced in TfR2-KO UT7 cells, and abrogated after treatment with the proteasome inhibitor MG132 (**Figure 2C**), suggesting a decreased degradation of EPO-R in TfR2-KO UT7 cells (20).

However, we observed no impact of Holo-Tf on TfR2 protein levels in WT UT7 cells (**Figure 2D**), suggesting that the decrease of EPO-R degradation did not involve a decrease in TfR2 protein expression.

In culture, TfR2-KO UT7 cells were more sensitive to EPO as compared with WT cells (**Figure 2E**), but addition of Holo-Tf had no impact on either cell proliferation or survival (**Figure 2F**).

Collectively, our results suggest that the loss of TfR2 in erythroid cells improves EPO-R signaling and abolishes the beneficial effect of Holo-Tf on EPO-R-associated signaling cascade.

Discussion

In this work, we show a functional cooperation between Holo-Tf and EPO on major signaling pathways involved in erythroblast proliferation and survival: STAT5, PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways. This increase of EPO-sensitivity induced by holo-Tf could involve TfR1's newly described signaling function, as it is independent of endocytosis.

We found a similar cooperation between Holo-Tf and IL-2 in the T-lymphocytes KIT225 cell line, suggesting a common mechanism of interaction between Holo-Tf and cytokine receptors in several cell types.

Interestingly, even though it has been described that TfR2 stabilizes EPO-R (13), we uncovered that loss of TfR2 increased EPO-R expression and signaling in TfR2-KO UT7 cells. Our findings are in accordance with a recent work in a thalassemia intermediate mouse model lacking TfR2 in the bone marrow. In this model, the erythroid cells were more susceptible to EPO stimulation, resulting in improved erythropoiesis and red blood cell morphology (21). In agreement with our data, this information suggests that loss of TfR2 could enhance EPO sensitivity, which may be an effective strategy for treatment of anemia. In conclusion, TfR1 could have very valuable capacities besides cellular iron uptake. Our work confirms a beneficial role of Holo-Tf independently of TfR1 endocytosis, and highlights an inhibitory role of TfR2 on EPO-R signaling. Our findings shed light on the impact of transferrin and its receptors in the regulation of EPO sensitivity and EPO-R-associated signaling pathways.

Acknowledgements.

This work was supported by the Ligue Nationale contre le Cancer (grant EL2015.LNCC/OIH), the Institut National Contre le Cancer (grant TRANSLA13-087), the Cancéropôle d'Ile 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 by an ATIP-Avenir grant attributed to ICM. This study was supported by grants from Laboratory of Excellence GR-Ex, reference ANR-11-LABX-0051. The Imagine Institute and the labex GR-Ex are funded by the program "Investissements d'avenir" of the French National Research Agency (references ANR-10-IAHU-01 and ANR-11-IDEX-0005-02, respectively).

G.F. is supported by Institut National du Cancer (INCA).

Authorship Contributions.

Conception and design: KB, GF, IM

Conduction of experiments:

Collection and assembly of data:

Data analysis and interpretation:

Manuscript writing:

Disclosure of Conflicts of Interest.

The authors do not have any conflicts of interest to declare in relation to this work.

References.

1. Goldwasser E. Erythropoietin and its mode of action. *Blood cells*. 1984;10(2-3):147-62.
2. Goldwasser E, Krantz SB, Wang FF. Erythropoietin and erythroid differentiation. *Symposium on Fundamental Cancer Research*. 1984;37:103-7.
3. Hodges VM, Rainey S, Lappin TR, Maxwell AP. Pathophysiology of anemia and erythrocytosis. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2007;64(2):139-58.
4. Koury MJ, Bondurant MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science (New York, NY)*. 1990;248(4953):378-81.
5. Kelley LL, Koury MJ, Bondurant MC, Koury ST, Sawyer ST, Wickrema A. Survival or death of individual proerythroblasts results from differing erythropoietin sensitivities: a mechanism for controlled rates of erythrocyte production. *Blood*. 1993;82(8):2340-52.
6. Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, Kuo F, Andrews NC. Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nature genetics*. 1999;21(4):396-9.
7. Li H, Blanc L, Choesang T, Chen H, Feola M, Bao W, et al. Changes in TfR1 Expression and Trafficking Correlate with Erythroid Effectiveness in β -Thalassemic Mice. *Blood*. 2014;124(21):51-.
8. Lebron JA, Bennett MJ, Vaughn DE, Chirino AJ, Snow PM, Mintier GA, et al. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell*. 1998;93(1):111-23.
9. Radoshitzky SR, Abraham J, Spiropoulou CF, Kuhn JH, Nguyen D, Li W, et al. Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature*. 2007;446(7131):92-6.
10. Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Andrews NC. The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell metabolism*. 2008;7(3):205-14.
11. Coulon S, Dussiot M, Grapton D, Maciel TT, Wang PH, Callens C, et al. Polymeric IgA1 controls erythroblast proliferation and accelerates erythropoiesis recovery in anemia. *Nature medicine*. 2011;17(11):1456-65.
12. Gao J, Chen J, Kramer M, Tsukamoto H, Zhang AS, Enns CA. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell metabolism*. 2009;9(3):217-27.
13. Forejtnikova H, Vieillevoys M, Zermati Y, Lambert M, Pellegrino RM, Guihard S, et al. Transferrin receptor 2 is a component of the erythropoietin receptor complex and is required for efficient erythropoiesis. *Blood*. 2010;116(24):5357-67.
14. 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(9):2714-9.
15. Vogt TM, Blackwell AD, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Enns CA. Heterotypic interactions between transferrin receptor and transferrin receptor 2. *Blood*. 2003;101(5):2008-14.
16. Zermati Y, Fichelson S, Valensi F, Freyssinier JM, Rouyer-Fessard P, Cramer E, et al. Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. *Experimental hematology*. 2000;28(8):885-94.
17. 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. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(4):417-25.
18. Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Developmental cell*. 2006;10(6):839-50.
19. Walrafen P, Verdier F, Kadri Z, Chretien S, Lacombe C, Mayeux P. Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood*. 2005;105(2):600-8.

20. Artuso I, Lidonnici MR, Altamura S, Mandelli G, Pettinato M, Muckenthaler MU, et al. Transferrin receptor 2 is a potential novel therapeutic target for beta-thalassemia: evidence from a murine model. *Blood*. 2018;132(21):2286-97.
21. Nai A, Lidonnici MR, Rausa M, Mandelli G, Pagani A, Silvestri L, et al. The second transferrin receptor regulates red blood cell production in mice. *Blood*. 2015;125(7):1170-9.

Supplemental methods.

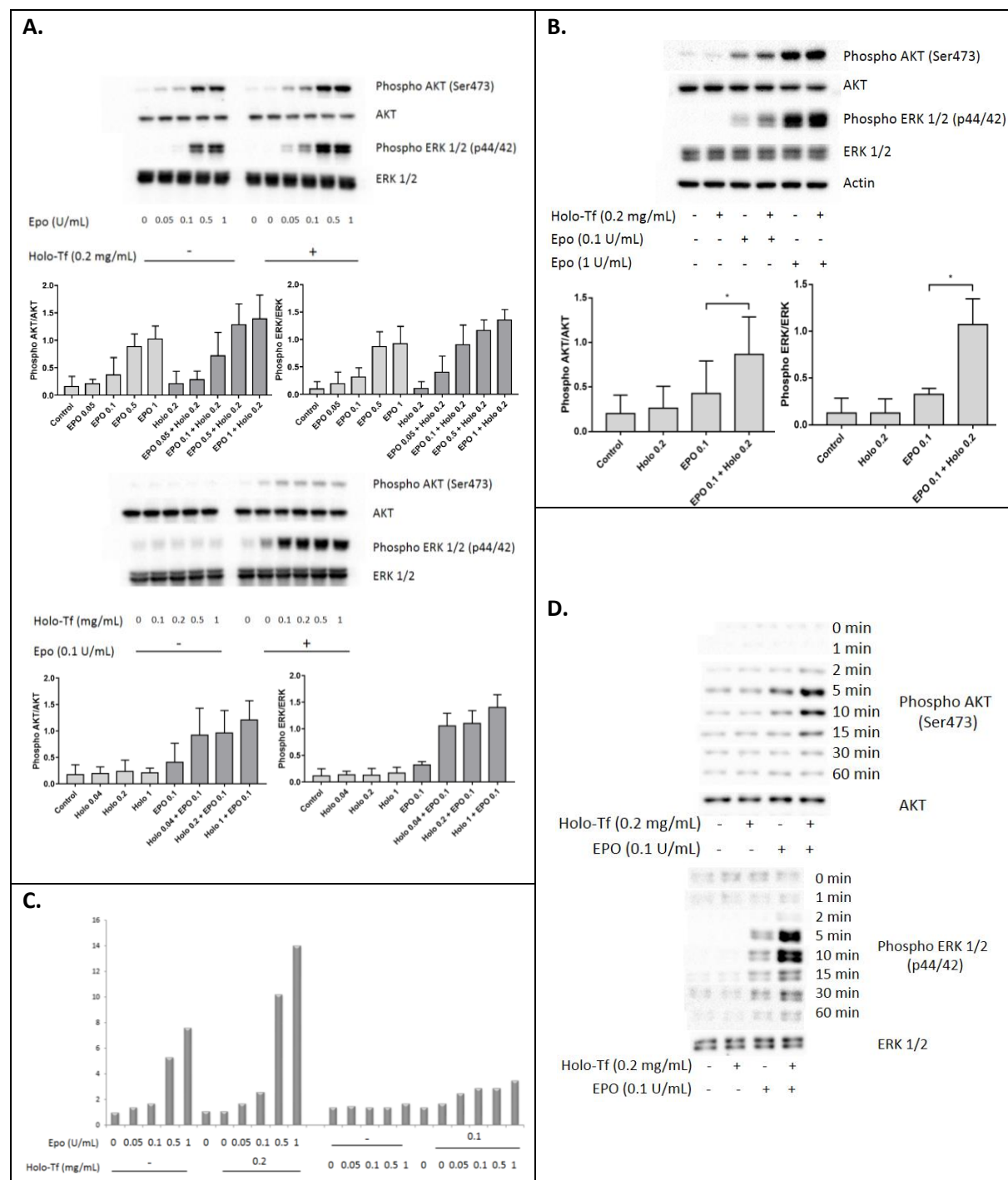
CRISPR/Cas9.

We designed and ordered 3 different sgRNA from Eurofins targeting TfR2 (sequence ACGCTGGTAGACGGTCTGAG, TCTGACTCAGGACATTCGCG and TGGACCGACACGCACTACGT). After ligation in a LentiCRISPRv1 vector GFP and transformation in Stbl3 bacteria (One Shot Stbl3 Chemically Competent *E. coli* from Thermofischer), correct insertion was verified by PCR and Sanger sequencing. The 3 sgRNA were co-transfected in UT-7/EPO cells and cells were selected by GFP expression. After single cell cloning, 6 clones were selected after western blot analysis and 3 were used for the experiments.

KIT225 culture and stimulation.

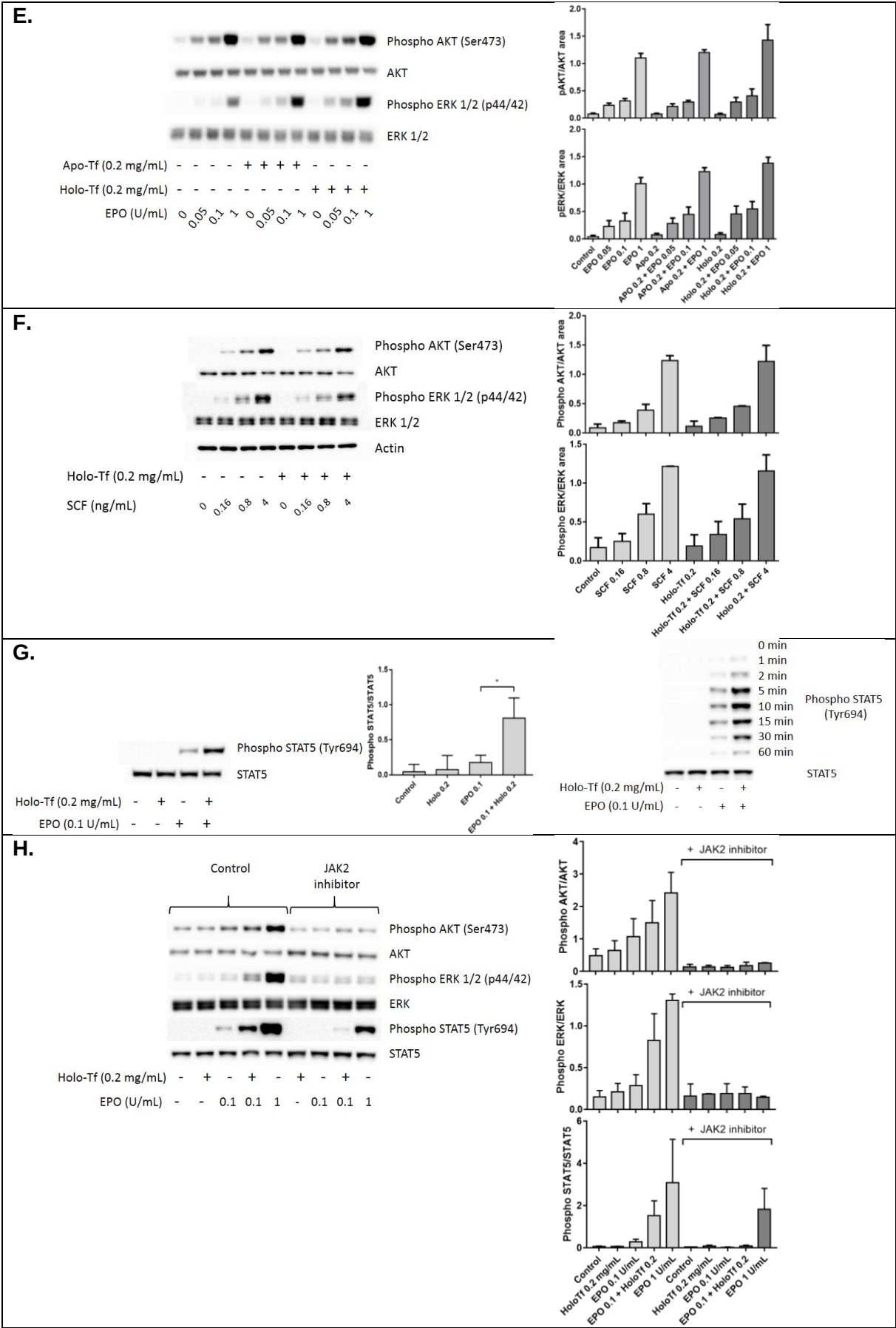
KIT225 cells are a human T-lymphocyte cell line dependent on interleukin-2 (IL-2) for proliferation and survival. They were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 20 units/ml of recombinant IL-2, penicillin and streptomycin at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. To starve cells from growth factors, the cells were washed and placed for 16-18 hours in IMDM medium containing 0.4% BSA. During the last 4 hours, the cells were also starved of transferrin using 5 µM ferric nitrilotriacetate (NTA). We then treated the cells at 37°C with IL-2, holo-transferrin and/or apo-transferrin at varying concentrations and for varying times before stopping the reaction by the addition of an excess of cold PBS.

Figure 1. Holo-Tf improves EPO-R signaling in UT7/EPO cells. (1/3)

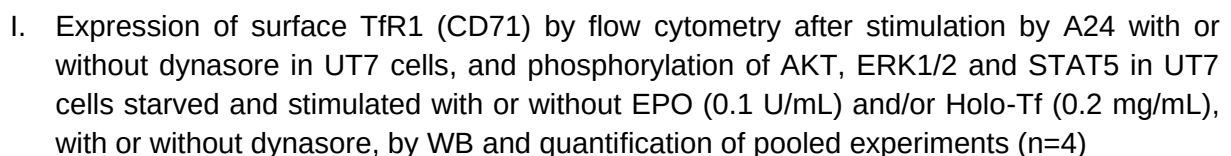


- A. Phosphorylation of AKT and ERK1/2 evaluated by immunoblotting in UT7 cells starved and stimulated with or without EPO (0 to 1 U/mL) and/or Holo-Tf (0 to 2 mg/mL), WB and quantification (n=5)
- B. Phosphorylation of AKT and ERK1/2 in UT7 cells starved and stimulated with or without EPO (0, 0.1 or 1 U/mL) and/or Holo-Tf (0.2 mg/mL), WB and quantification (n=10); * p<0,01
- C. Phosphorylation of ERK1 and 2 evaluated by NanoPro in UT7 cells starved and stimulated with or without EPO (0 to 1 U/mL) and/or Holo-Tf (0 to 1 mg/mL) (n=1)
- D. Phosphorylation of AKT and ERK1/2 in UT7 cells starved and stimulated from 0 to 60 minutes with or without EPO (0.1 U/mL) and/or Holo-Tf (0.2 mg/mL), representative WB (n=3)

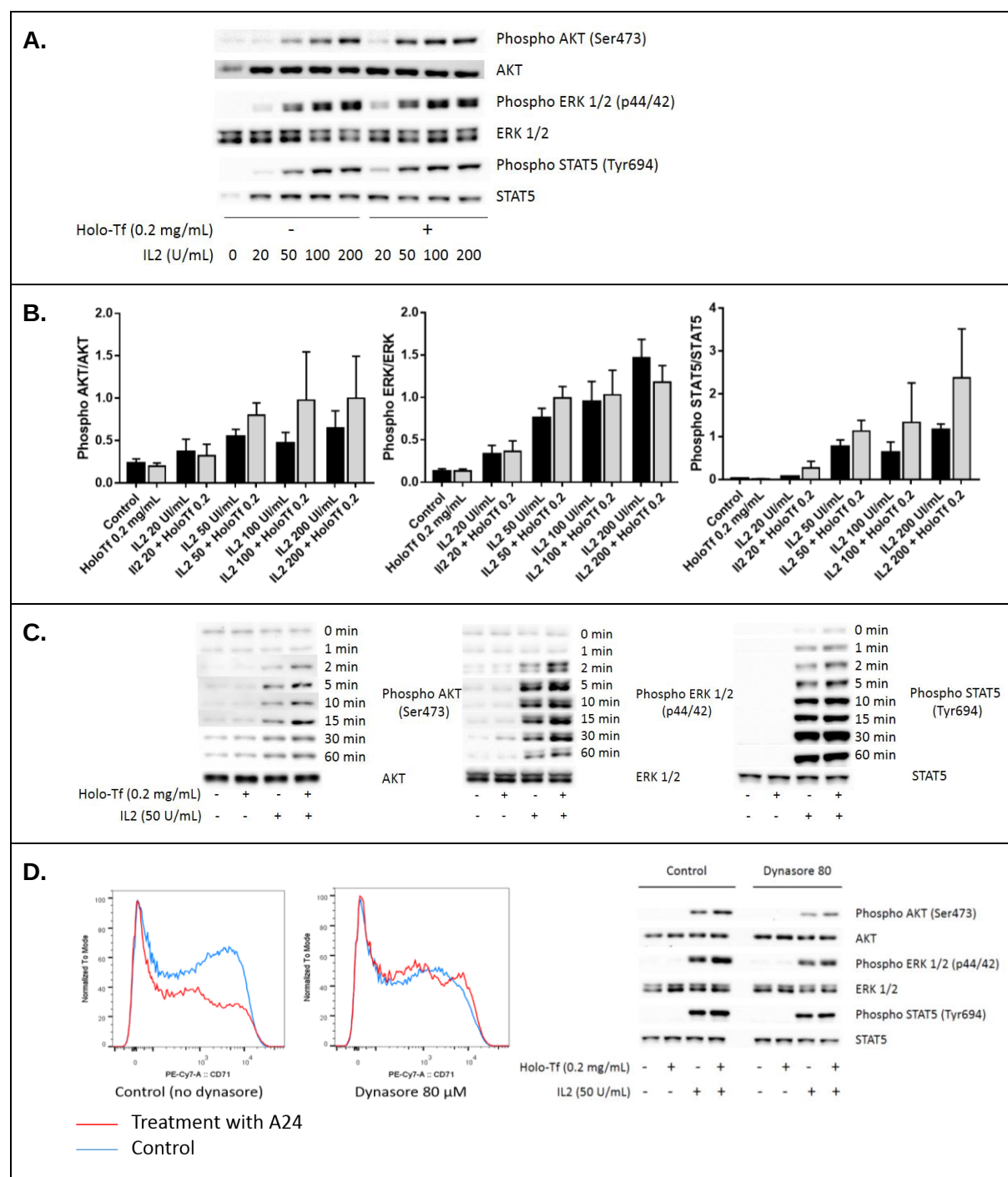
Figure 1. Holo-Tf improves EPO-R signaling in UT7/EPO cells. (2/3)



- Figure 1. Holo-Tf improves EPO-R signaling in UT7/EPO cells. (3/3)**



Supplemental Figure 1. Holo-Tf improves IL-2R signaling in KIT225 cells.



- Phosphorylation of AKT, ERK1/2 and STAT5 evaluated by immunoblotting in KIT225 cells starved of IL2 and stimulated with or without IL2 (0 to 200 U/mL) and/or Holo-Tf (0.2 mg/mL)
- Quantification of phosphorylation of AKT, ERK1/2 and STAT5 in KIT225 cells starved of IL2 and stimulated with or without IL2 (0 to 200 U/mL) and/or Holo-Tf (0.2 mg/mL) (n=6)
- Phosphorylation of AKT, ERK1/2 and STAT5 in starved and stimulated KIT225 cells from 0 to 60 minutes with or without IL2 (50 U/mL) and/or Holo-Tf (0.2 mg/mL)
- Expression of surface TfR1 (CD71) by flow cytometry after stimulation by A24 with or without dynasore in KIT225 cells, and phosphorylation of AKT, ERK1/2 and STAT5 in KIT225 cells starved and stimulated with or without IL2 (50 U/mL) and/or Holo-Tf (0.2 mg/mL), with or without dynasore

A.

WT Tfr2-KO

Phospho AKT (Ser473)
AKT
Phospho ERK 1/2 (p44/42)
ERK
Phospho STAT5 (Tyr694)
STAT5

EPO (U/mL) 0 0.05 0.1 1 2 0.05 0.1 1 2 0 0.05 0.1 1 2 0.05 0.1 1 2

Holo-Tf (0.2 mg/mL) - + - + - + - +

WT Tfr2-KO

Phospho AKT (Ser473)
AKT
Phospho ERK 1/2 (p44/42)
ERK
Phospho STAT5 (Tyr694)
STAT5

Holo-Tf (mg/mL) 0 0.04 0.2 1 0 0.04 0.2 1 0 0.04 0.2 1 0 0.04 0.2 1

EPO (0.1 U/mL) - + - + - + - +

Phospho AKT/AKT
Phospho ERK/ERK
Phospho STAT5/STAT5

B.

WT Tfr2-KO

Tfr2
Tfr1 (CD71)
EPO-R
PhosphoSTAT5 (Tyr694)
STAT5
Actin

Holo-Tf (0.2 mg/mL) - + - + - + - +

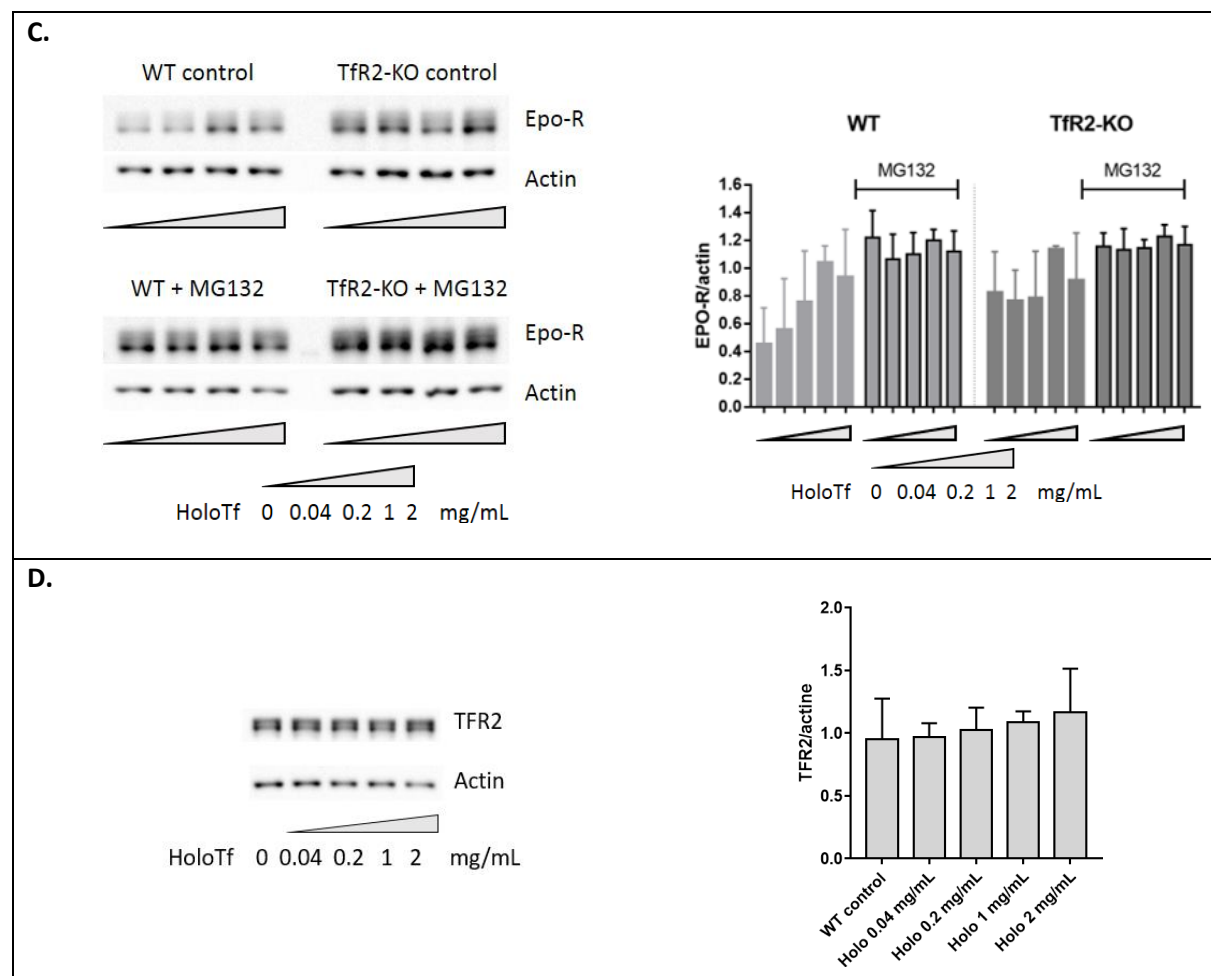
EPO (0.1 U/mL) - + - + - + - +

CD71/actin
Tfr2/actin
EPO-R/actin

WT control
WT EPO + Holo
CRISPR control
CRISPR EPO + Holo

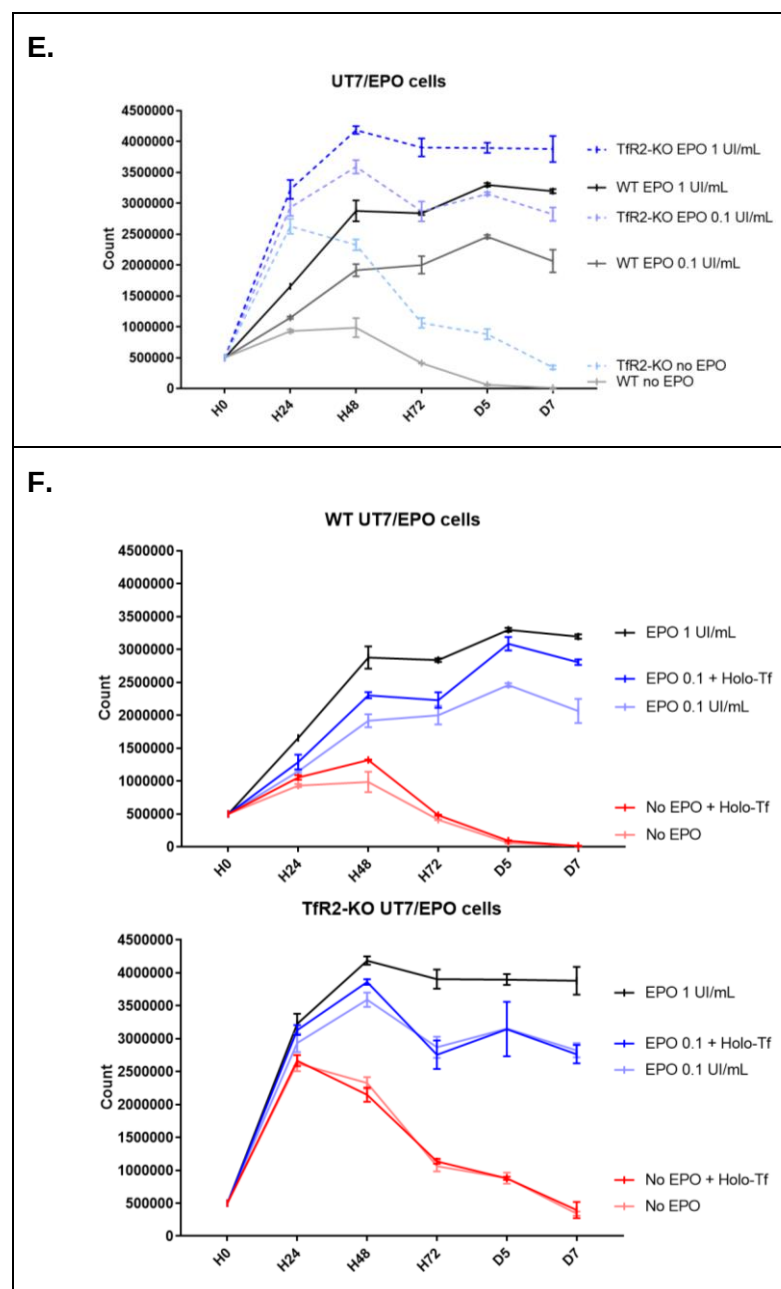
B. Expression of TfR2, TfR1, EPO-R and phosphorylation of STAT5 in WT or CRISPR TfR2 UT7 cells starved and stimulated with or without EPO (0.1 U/mL) and/or Holo-Tf (0.2 mg/mL), WB and quantification (n=3)

Figure 2. Knock-out of TfR2 improves EPO-R signaling, but abrogates the effect of Holo-Tf, in UT7/EPO cells (2/3)



- C. Expression of EPO-R evaluated by immunoblotting in WT and CRISPR TfR2 UT7 cells starved and stimulated with increasing concentrations of Holo-Tf (0 to 2 mg/mL), with or without the proteasome inhibitor MG132, WB and quantification (n=4)
- D. Expression of TfR2 evaluated by immunoblotting in WT UT7 cells starved and stimulated with increasing concentrations of Holo-Tf (0 to 2 mg/mL), WB and quantification (n=3)

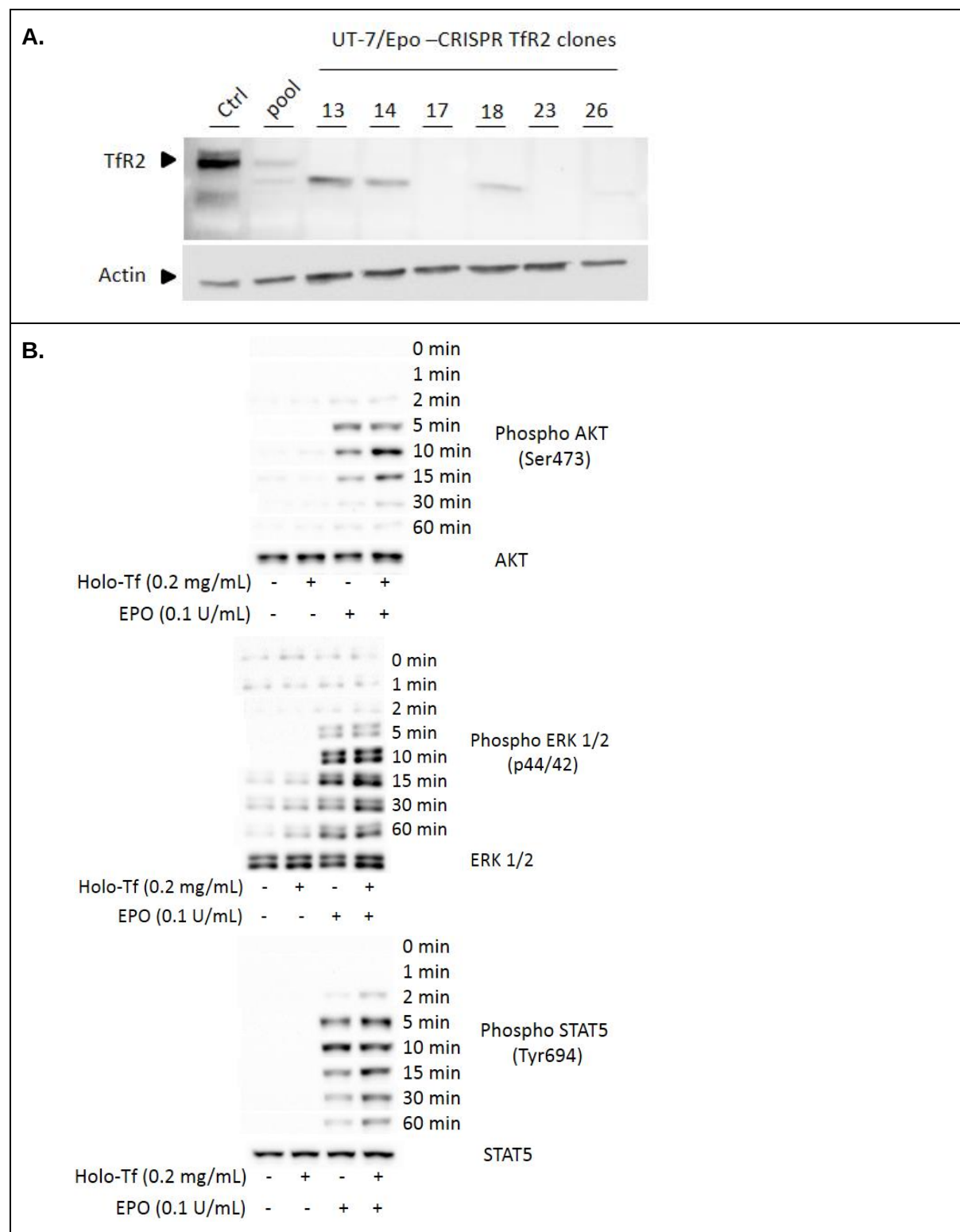
Figure 2. Knock-out of TfR2 improves EPO-R signaling, but abrogates the effect of Holo-Tf, in UT7/EPO cells (3/3)



E. Evolution of the number of WT and CRISPR TfR2 UT7 cells cultured in presence or absence of EPO (n=3)

F. Evolution of the number of WT and CRISPR TfR2 UT7 cells cultured in presence or absence of EPO and/or Holo-Tf (0.2 mg/mL) (n=3)

Supplemental Figure 2. TfR2-KO UT7/EPO cells.



- A. Expression of TfR2 evaluated by immunoblotting in control UT-7 cells, pool and clones of TfR2-KO UT7 cells by CRISPR/Cas9
- B. Phosphorylation of AKT, ERK1/2 and STAT5 in starved and stimulated TfR2-KO UT7 cells from 0 to 60 minutes with or without EPO (0.1 U/mL) and/or Holo-Tf (0.2 mg/mL)

1.2. AUTRES RESULTATS

1.2.1. CONTEXTE

Puisque nous avons trouvé une coopération fonctionnelle entre la transferrine et l'EPO, nous avons cherché à déterminer si les récepteurs TfR1 et EPO-R interagissaient ensemble, directement ou à travers un complexe protéique. Sachant qu'une interaction entre TfR1 et EPO-R n'a jamais été retrouvée, nous avons émis l'hypothèse que leur interaction pourrait être indirecte, et impliquer d'autres protéines. Parmi les protéines cibles, nous nous sommes intéressés au TfR2 : celui-ci est en effet exprimé par les cellules de la lignée érythroïde, et il a été démontré qu'il interagissait avec l'EPO-R (Forejtnikova et al. 2010). Des associations entre TfR1 et TfR2, au moins sous forme d'hétérodimères, ont également été décrites (Vogt et al. 2003).

Parmi les autres cibles possibles, il a été démontré que STAT5 était capable d'activer les voies PI3K/AKT et MAPK, via une protéine nommée Gab2 (Grb2 (growth-factor-receptor-bound protein 2)-associated binder-2) (Nyga et al. 2005) déjà connue pour être impliquée dans la signalisation induite par la thrombopoïétine (Bouscary et al. 2001). Ainsi, en plus de sa fonction « canonique », STAT5 semble également capable de réguler différentes cascades de signalisation. Nous nous sommes donc posé la question de la présence de STAT5 au sein de notre complexe protéique.

D'autres protéines sont connues pour interagir avec la voie de signalisation de l'EPO-R, et notamment les protéines de la famille Src. Les protéines de cette famille sont des protéines à activité tyrosine kinase non liées à des récepteurs, mais capables d'amplifier la signalisation de plusieurs récepteurs (Parsons and Parsons 2004). Cette famille comprend au moins 9 membres structurellement similaires : Src, Lyn, Fyn, Yes, Lck, Fgr, Hck, Blk, Yrk, ainsi qu'un régulateur négatif très important nommé Csk (Okada 2012). Au moins deux de ces protéines sont connues pour être impliquées dans la signalisation de l'EPO-R : Lyn, qui interagit physiquement avec l'EPO-R et est capable de phosphoryler STAT5 (Chin et al. 1998), et Src, également capable d'activer directement STAT5 par phosphorylation (Okutani et al. 2001).

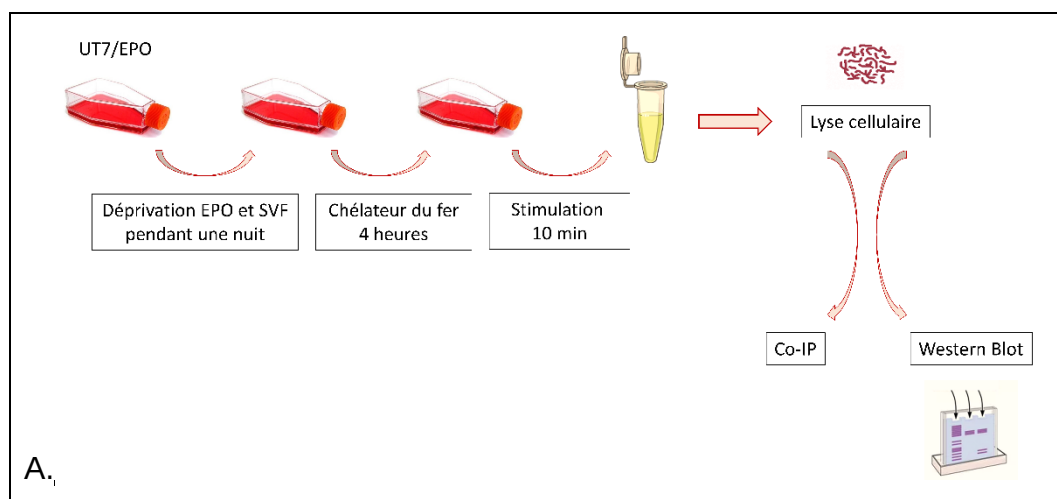
Nous avons donc voulu déterminer s'il existait un complexe protéique incluant TfR1, TfR2, EPO-R, STAT5, et des protéines de la famille Src.

1.2.1. MÉTHODES ET RÉSULTATS

Pour ceci, nous avons utilisé plusieurs techniques présentées ci-dessous : co-immunoprécipitation, protéomique, Duolink® (technique de ligation de proximité) et pull down.

Co-immunoprécipitation

Pour les essais d'immunoprécipitation, nous avons travaillé sur les cellules UT7/EPO déprivées en EPO et en SVF (sérum de veau fœtal) pendant une nuit, soumises à un chélateur du fer pendant les 4 dernières heures (le nitrilotriacétate ferrique ou NTA), puis stimulées 10 minutes avec ou sans EPO (0,1 UI/mL) et holo-transferrine (0,2 mg/mL). Après blocage de la réaction avec du PBS froid, les cellules sont lavées puis lysées (**Figure 22A**). Le lysat est d'abord mis en contact avec l'anticorps immunoprécipitant ou un isotype, puis avec des billes magnétiques couplées à la protéine G. Après incubation, les billes magnétiques sont lavées à l'aide d'un aimant, puis éluées. Le surnageant contenant les protéines d'intérêt est ensuite analysé par western blot (**Figure 22B**).



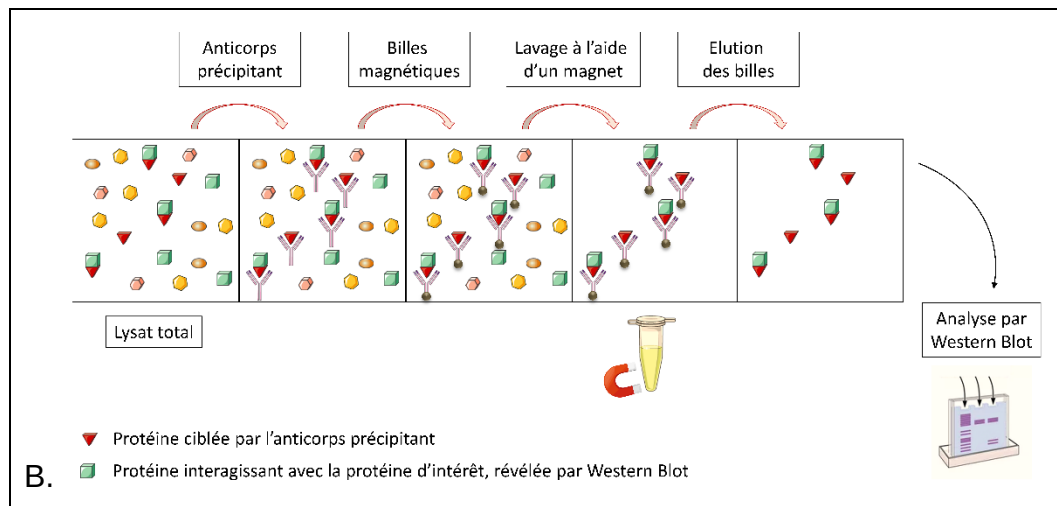


Figure 22. Technique de co-immunoprécipitation.

(A) Préparation des cellules UT7/EPO, le lysat cellulaire peut être directement analysé par Western Blot ou utilisé pour la co-immunoprécipitation (B).

Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous (**Figure 23**). Globalement, les résultats semblaient en faveur de l'existence d'un complexe protéique impliquant TfR1, TfR2, EPO-R et STAT5. Cependant, il persistait des doutes sur la spécificité des différents anticorps utilisés, notamment en raison de la présence de bandes détectées avec les isotypes contrôles. De plus, le TfR1 est connu pour être un contaminant fréquent en immunoprécipitation, rendant difficile l'interprétation de ces expériences – à noter que des techniques plus sensibles utilisant en particulier de l'EPO radioactive n'ont jamais retrouvé d'interaction entre TfR1 et EPO-R (data not shown, Forejtnikova *et al.* (Forejtnikova *et al.* 2010)). Par ailleurs, les modifications de l'intensité des bandes détectées en fonction du traitement des cellules n'étaient pas systématiquement reproductibles. En raison de ces limites, nous n'avons pas pu tirer de conclusion définitive de ces expériences.

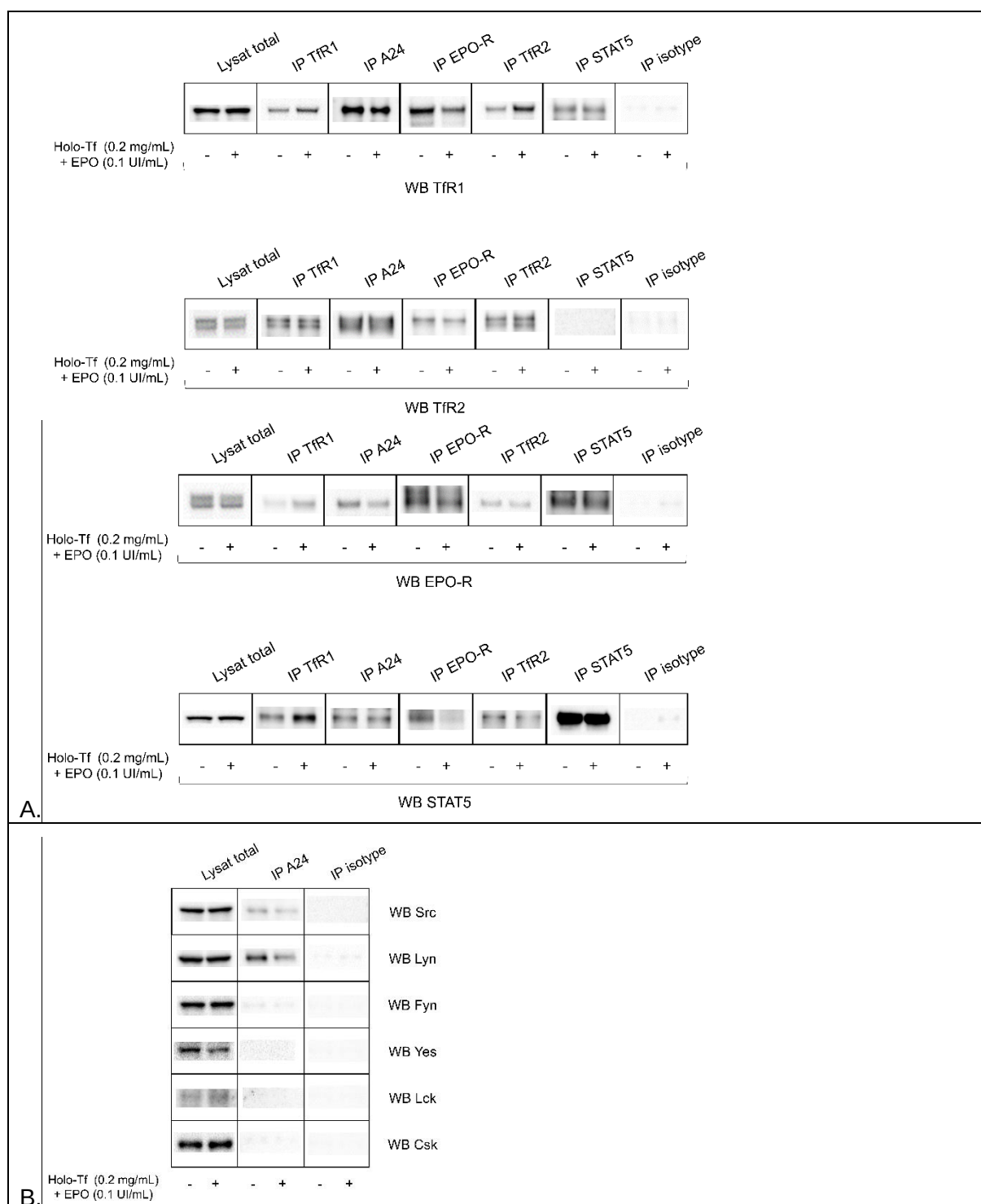


Figure 23. Résultats des co-immunoprécipitations. (A) Immunoprécipitation avec des anticorps anti-TfR1 (TfR1 : anticorps commercial, A24 : anticorps produit, purifié et caractérisé au sein du laboratoire), anti-EPO-R (anticorps PAB 58S fourni par Patrick Mayeux, institut Cochin), anti-TfR2, anti-STAT5, ou isotype contrôle. Révélation par Western Blot avec anticorps anti-TfR1, TfR2, EPO-R (fourni par Patrick Mayeux, institut Cochin), STAT5. (B) Immunoprécipitation avec l'anticorps A24, révélation par Western Blot avec des anticorps anti-Src, Lyn, Fyn, Yes, Lck, Csk.

Concernant les protéines de la famille Src, parmi les 6 protéines testées, seules deux protéines étaient détectées après avoir immunoprécipité le TfR1 par l'anticorps A24 : Src et Lyn. A noter que Lck était très faiblement détectable dans le lysat total des UT7/EPO.

Nous avons donc voulu déterminer si ces deux protéines pouvaient être impactées par un traitement par holo-transferrine. Une analyse représentative par Western Blot est présentée **Figure 24**. La phosphorylation de Lyn ne semblait modifiée ni par l'EPO, ni par l'holo-transferrine. La phosphorylation de Src augmentait sous EPO, sans impact notable de l'ajout d'holo-transferrine. Devant ces résultats, nous n'avons pas poursuivi l'étude de ces protéines dans le cadre de ce projet.

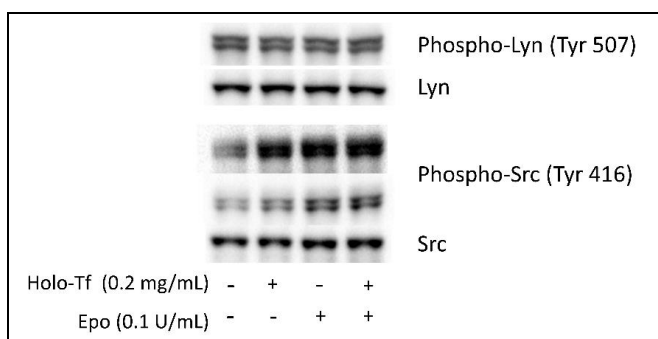


Figure 24. Analyse de la phosphorylation de Src et Lyn par Western Blot sur des cellules UT7/EPO déprivées en SVF et EPO puis stimulées avec de l'EPO (0,1 UI/mL) et/ou de l'holo-transferrine (0,2 mg/mL) (figure représentative, n=2).

Protéomique

Afin d'étudier de façon plus spécifique les protéines interagissant avec le TfR1, nous avons réalisé une analyse protéomique en coopération avec la plateforme de protéomique de l'institut Cochin. Pour ceci, nous avons suivi un protocole similaire au protocole d'immunoprécipitation présenté **Figure 22**, avec 6 échantillons : IP TfR1 avec et sans traitement par EPO 0,1 UI/mL et holo-transferrine 0,2 mg/mL, IP A24 avec et sans traitement, IP isotype contrôle avec et sans traitement. Cette analyse n'a fait que confirmer l'interaction entre TfR1 et TfR2. EPO-R et STAT5 ont également été trouvés parmi les partenaires de TfR1, mais sans différences significatives par rapport au témoin (IgG de lapin). Le TfR1 est également connu pour être un contaminant fréquent en protéomique, rendant difficile l'interprétation de cette expérience. Nous avons ensuite voulu réaliser une expérience de protéomique quantitative par la méthode SILAC, qui n'a malheureusement pas donné de résultats analysables.

Duolink®

Etant donné les difficultés rencontrées au cours des expériences d'immunoprécipitation et de protéomique, nous avons voulu tenter d'explorer une possible liaison entre nos protéines d'intérêt par la technique du Duolink, ou technique de ligation de proximité. Le principe de la technique est présenté **Figure 25**, d'après le protocole disponible chez Sigma Aldrich.

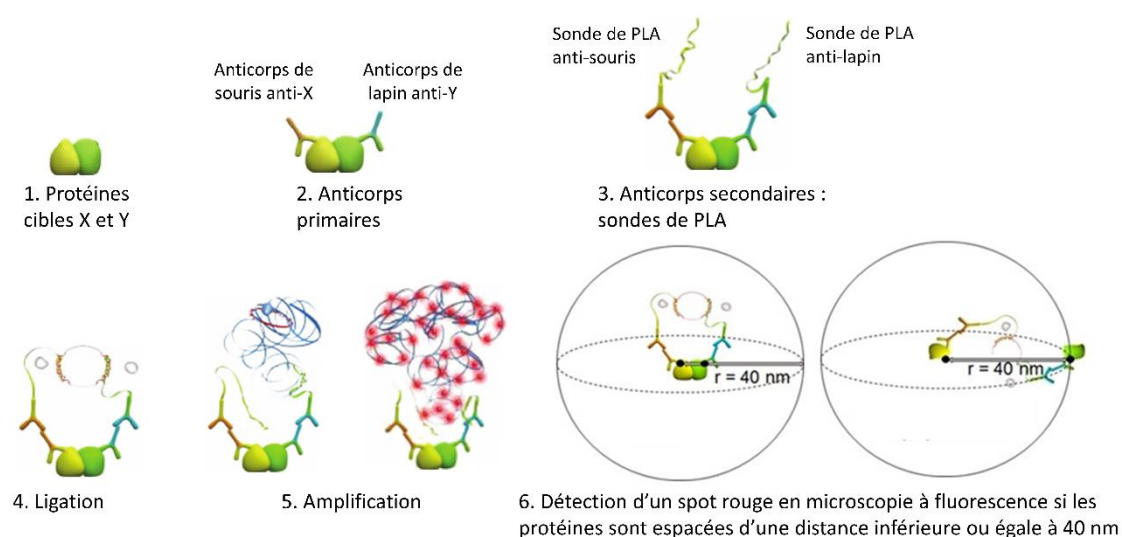


Figure 25. Technique de ligation de proximité.

Dans cette technique, la ligation, l'amplification et donc la détection d'un spot de couleur sont possibles si les deux protéines d'intérêt sont séparées d'une distance inférieure ou égale à 40 nm, qu'elles présentent ou non une interaction directe.

Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous (**Figure 26**). Globalement, ces résultats étaient en faveur d'une proximité entre nos protéines d'intérêt : TfR1, TfR2, EPO-R et STAT5. Les interactions entre EPO-R et TfR1, et EPO-R et TfR2, semblaient augmenter après traitement des cellules avec des concentrations physiologiques d'holo-transferrine et d'EPO. Cependant, l'interprétation des résultats était à nouveau gênée par une suspicion de manque de spécificité des anticorps utilisés dans le cadre de cette technique, liée à la détection de quelques spots dans nos conditions contrôles. Le nombre de spots le plus important était observé entre les protéines TfR1 et TfR2, ce qui peut être biaisé par une reconnaissance croisée liée à la similarité de TfR1 et TfR2. Le nombre de spots le plus faible était observé entre EPO-R et TfR2, et EPO-R et STAT5, possiblement lié au faible nombre de protéines d'EPO-R dans nos cellules, relativement à l'expression du TfR1 (environ 6 millions de TfR1 contre 6 000 molécules d'EPO-R dans une cellule UT7).

Protéines étudiées	Résultats poolés (n=3)	Image représentative, condition EPO 0,1UI/mL + Holo-Tf 0,2mg/mL								
TfR1 / TfR2	<table><thead><tr><th>Treatment</th><th>Normalized number of spots by cell</th></tr></thead><tbody><tr><td>EPO 0.1</td><td>1.0</td></tr><tr><td>EPO 0.1 + Holo 0.2</td><td>1.0</td></tr><tr><td>EPO 1</td><td>2.5</td></tr></tbody></table> Untreated control Mean = 6.5 spots/cell	Treatment	Normalized number of spots by cell	EPO 0.1	1.0	EPO 0.1 + Holo 0.2	1.0	EPO 1	2.5	
Treatment	Normalized number of spots by cell									
EPO 0.1	1.0									
EPO 0.1 + Holo 0.2	1.0									
EPO 1	2.5									
TfR1 / EPO-R	<table><thead><tr><th>Treatment</th><th>Normalized number of spots by cell</th></tr></thead><tbody><tr><td>EPO 0.1</td><td>2.0</td></tr><tr><td>EPO 0.1 + Holo 0.2</td><td>2.5</td></tr><tr><td>EPO 1</td><td>12.0</td></tr></tbody></table> Untreated control Mean = 0.3 spots/cell	Treatment	Normalized number of spots by cell	EPO 0.1	2.0	EPO 0.1 + Holo 0.2	2.5	EPO 1	12.0	
Treatment	Normalized number of spots by cell									
EPO 0.1	2.0									
EPO 0.1 + Holo 0.2	2.5									
EPO 1	12.0									
TfR1 / STAT5	<table><thead><tr><th>Treatment</th><th>Normalized number of spots by cell</th></tr></thead><tbody><tr><td>EPO 0.1</td><td>3.0</td></tr><tr><td>EPO 0.1 + Holo 0.2</td><td>4.0</td></tr><tr><td>EPO 1</td><td>20.0</td></tr></tbody></table> Untreated control Mean = 0.1 spots/cell	Treatment	Normalized number of spots by cell	EPO 0.1	3.0	EPO 0.1 + Holo 0.2	4.0	EPO 1	20.0	
Treatment	Normalized number of spots by cell									
EPO 0.1	3.0									
EPO 0.1 + Holo 0.2	4.0									
EPO 1	20.0									
EPO-R / TfR2	<table><thead><tr><th>Treatment</th><th>Normalized number of spots by cell</th></tr></thead><tbody><tr><td>EPO 0.1</td><td>1.5</td></tr><tr><td>EPO 0.1 + Holo 0.2</td><td>1.8</td></tr><tr><td>EPO 1</td><td>6.5</td></tr></tbody></table> Untreated control Mean = 0.6 spots/cell	Treatment	Normalized number of spots by cell	EPO 0.1	1.5	EPO 0.1 + Holo 0.2	1.8	EPO 1	6.5	
Treatment	Normalized number of spots by cell									
EPO 0.1	1.5									
EPO 0.1 + Holo 0.2	1.8									
EPO 1	6.5									
EPO-R / STAT5	<table><thead><tr><th>Treatment</th><th>Normalized number of spots by cell</th></tr></thead><tbody><tr><td>EPO 0.1</td><td>0.5</td></tr><tr><td>EPO 0.1 + Holo 0.2</td><td>0.5</td></tr><tr><td>EPO 1</td><td>1.8</td></tr></tbody></table> Untreated control Mean = 0.6 spots/cell	Treatment	Normalized number of spots by cell	EPO 0.1	0.5	EPO 0.1 + Holo 0.2	0.5	EPO 1	1.8	
Treatment	Normalized number of spots by cell									
EPO 0.1	0.5									
EPO 0.1 + Holo 0.2	0.5									
EPO 1	1.8									

Figure 26. Résultats des expériences de Duolink®.

Pull down

Lorsque nous nous sommes posé la question des partenaires potentiels du TfR1, nous nous sommes également interrogés sur le site d'interaction possible. La tyrosine 20 (Y²⁰) du domaine intra-cellulaire du TfR1 est essentielle pour l'endocytose du récepteur (Fleming et al. 2000), mais également pour sa fonction de signalisation (Coulon et al. 2011). Nous avons donc voulu savoir si cette tyrosine pouvait être importante pour l'interaction du TfR1 avec ses partenaires potentiels.

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons utilisé des peptides correspondant au domaine transmembranaire et intra-cellulaire du TfR1 avec une tyrosine 20 de type sauvage (WT), phosphorylée (Phospho-Tyr²⁰) ou mutée (remplacement de la tyrosine par une histidine : Tyr²⁰ → His). Ces peptides étaient couplés avec des billes magnétiques. Nous les avons incubés avec les lysats cellulaires de nos cellules UT7 déprivées puis stimulées 10 minutes avec ou sans EPO (0,1 UI/mL) et holo-transferrine (0,2 mg/mL) (voir **Figure 22A**). Les peptides étant déjà couplés à des billes magnétiques, nous avons ensuite pu réaliser un pull down puis des lavages à l'aide d'un aimant, puis éluer les billes et étudier les protéines d'intérêt couplées aux peptides par Western Blot (**Figure 27**).

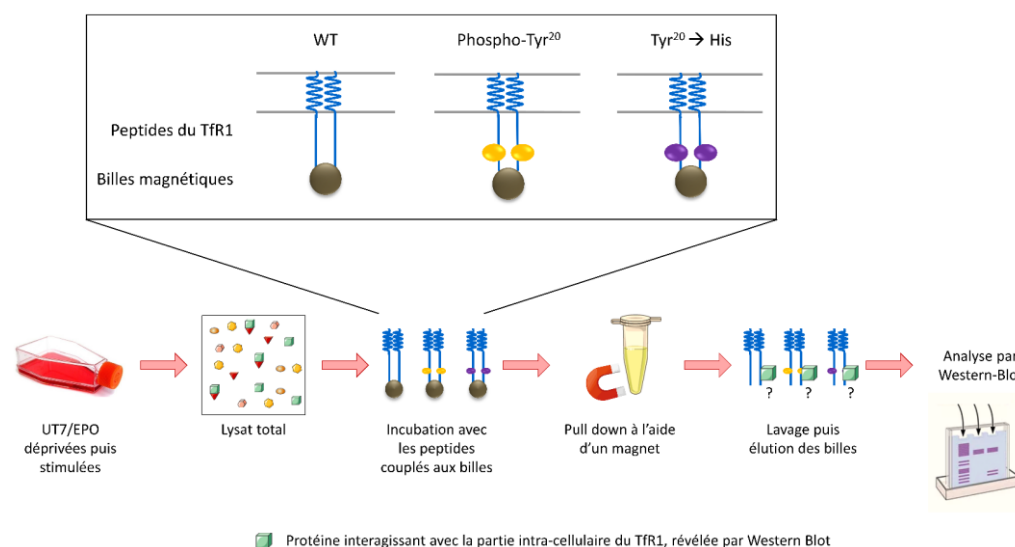


Figure 27. Technique du pull down utilisant des peptides du TfR1 couplés à des billes magnétiques.

Les résultats sont présentés ci-dessous (**Figure 28**). Globalement, les protéines retrouvées par immunoprécipitation étaient également retrouvées après pull down en utilisant les peptides du TfR1, et la mutation de la tyrosine 20 n'entraînait pas de perte d'interaction. Ces interactions semblaient renforcées par la phosphorylation de la

tyrosine 20. Cependant, ces résultats étaient encore une fois difficiles à interpréter en raison du caractère contaminant du TfR1, avec présence de bandes détectables également dans certains contrôles, de la même manière que pour les expériences de co-immunoprécipitation et de protéomique.

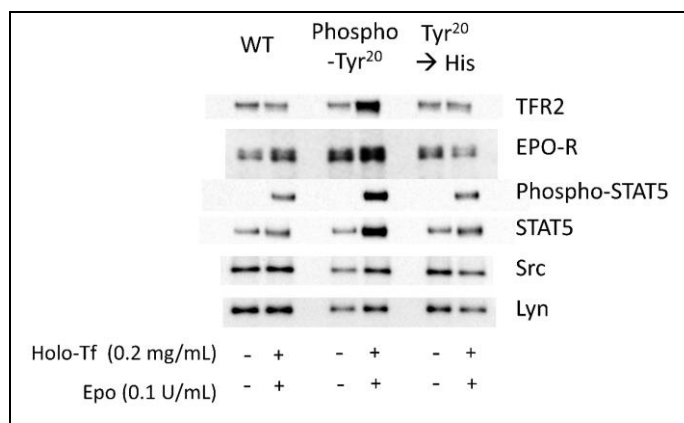


Figure 28. Analyse des expériences de pull down par Western Blot (figure représentative, n=3).

En conclusion, nos résultats suggèrent une proximité entre nos protéines d'intérêt : TfR1, TfR2, EPO-R et STAT5, ainsi que Src et Lyn, dans nos cellules UT7, sans que l'existence d'un complexe protéique incluant ces protéines puisse être établie. Des travaux complémentaires seront nécessaires pour répondre à cette question.

CRISPR

Parallèlement à l'exploration du complexe protéique, nous avons voulu déterminer le rôle de nos protéines d'intérêt dans les interactions du TfR1 avec ses partenaires potentiels ainsi que dans la fonction de signalisation du TfR1.

Pour ceci, nous avons envisagé d'inactiver nos différentes protéines par la technique d'édition de génome CRISPR/Cas9 dans nos cellules UT7. Nous n'avons pas réalisé d'inactivation du TfR1 ni de l'EPO-R en raison du caractère essentiel de ces protéines pour la survie des cellules UT7/EPO. STAT5 fait référence à deux protéines monomériques présentant plus de 90% de similarité protéique et pouvant s'associer, STAT5a et STAT5b. L'inactivation de STAT5a ou de STAT5b par CRISPR/Cas9 dans les UT7/EPO et dans les UT7/GM-CSF (dépendantes du GM-CSF et non de l'EPO) s'est avérée létale pour les cellules. A noter que chez la souris, le déficit en STAT5 est létal en raison du caractère essentiel de STAT5 dans la

signalisation de nombreux facteurs de croissance, dont l'EPO et le GM-CSF (Socolovsky et al. 1999). Nous avons donc ciblé nos travaux sur l'inactivation de TfR2. La génération des UT7/EPO KO pour le TfR2 a été faite en collaboration avec Carine Lefevre, dans le cadre de la plateforme CRISPR du GR-Ex. Les résultats des analyses de signalisation utilisant ces cellules sont présentés dans l'article ci-dessus ; nous avons également réalisé des expériences de co-immunoprécipitation dans ces cellules. Le protocole était le même que dans nos cellules UT7 wild-type (**Figure 22**), et les résultats sont présentés ci-dessous (**Figure 29**). Notre principale question était de savoir si l'absence de TfR2 entraînait une perte de l'interaction entre TfR1 et EPO-R : nous avons observé la présence de TfR1 après précipitation de l'EPO-R, mais sans détection de l'EPO-R après précipitation du TfR1. Ainsi, de nouveau, ces résultats ne nous semblaient pas suffisamment fiables pour nous permettre de tirer des conclusions définitives de ces expériences.

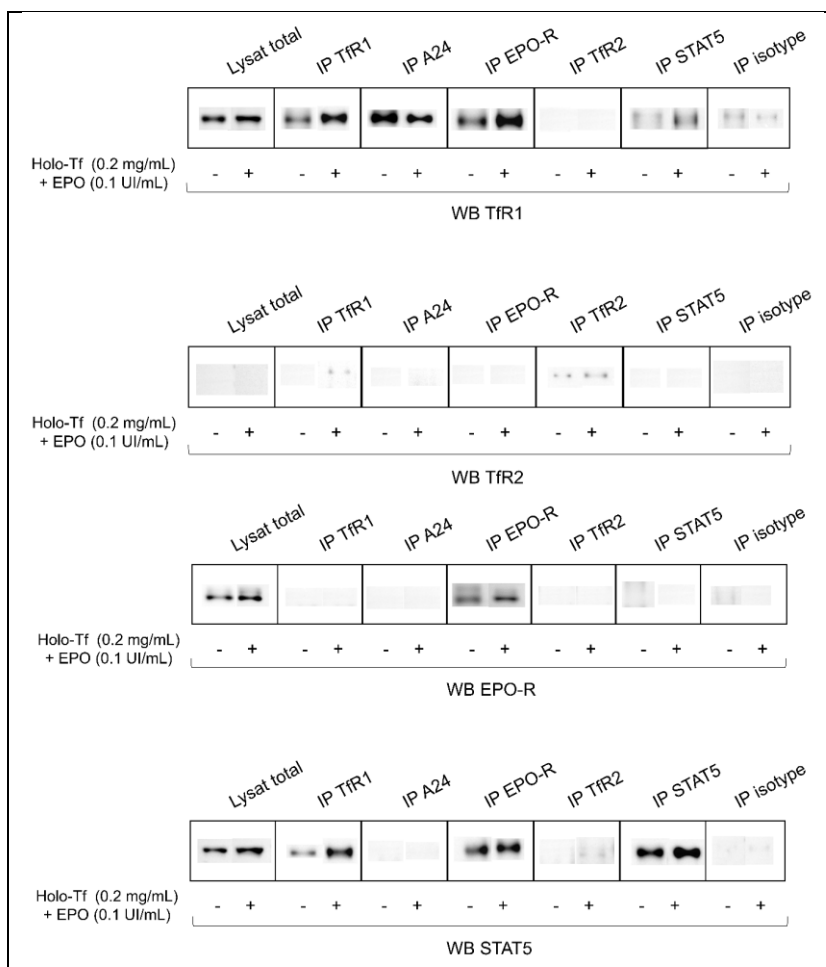


Figure 29. Résultats des co-immunoprécipitations dans les cellules UT7 TfR2-KO (anticorps et protocole : idem Figure 22).

2. **CURCUMA COMOSA, A PHYTOESTROGEN, PROMOTES ERYTHROPOIESIS THROUGH ACTIVATION OF THE ESTROGEN RECEPTOR ALPHA SIGNALING PATHWAY**

***Curcuma comosa*, a phytoestrogen, promotes erythropoiesis
through activation of the estrogen receptor alpha signaling pathway**

Kanit Bhukhai^{1,2,3*}, Guillemette Fouquet^{1,2*}, Olivier Hermine^{1,2,4,5} and Ivan C.Moura^{1,2}

Author's addresses.

1. Institut Hospitalo-Universitaire (IHU) Imagine, Université Sorbonne Paris cité, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Paris, France
2. INSERM U 1163 and CNRS ERL 8254, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Hôpital Necker, Paris, France
3. Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand
4. Laboratory of Excellence GReX, Paris, France
5. Service d'Hématologie clinique adultes, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Paris, France

*: KB and GF contributed equally to this work

Corresponding author.

Dr. Ivan C. Moura,

INSERM-UMR1163, Institut Imagine, 24 Bd du Montparnasse, 75015 Paris, France.

Phone: 33-1-4275-4285; Fax: 33-1-4275-4217; Email: ivan.moura@inserm.fr.

Pr Olivier Hermine,

INSERM-UMR1163, Institut Imagine, 24 Bd du Montparnasse, 75015 Paris, France.

Phone: 33-1-4275-4285; Fax: 33-1-4275-4217; Email: ohermine@gmail.com.

Running title. *Curcuma comosa* promotes erythropoiesis

Key words. Phytoestrogen, *Curcuma comosa*, erythropoiesis, estrogen receptor

Words. 1187 ; **Figures.** 2 ; **Tables.** 0 ; **Supplementary figures.** 1 ; **References.** 12

Key Points.

- In combination with EPO, Curcuma comosa and its compound ASPP049, promotes erythropoiesis both in human and mice.
- ASPP049 acts through activation of the estrogen receptor alpha, and increases EPO-induced phosphorylation of ERK, AKT and STAT5.

Introduction.

Erythropoiesis is a multistep process initiated by the commitment of pluripotent hematopoietic stem cells (HSC) into the erythroid lineage. This process is tightly regulated by multiple factors including erythropoietin (EPO) and Stem Cell Factor (SCF) (1, 2). Defects in erythropoiesis result in anemia, which can be observed in many situations and usually contributes to increase morbidity and mortality. Targeting erythropoiesis to improve erythroid differentiation and correct anemia would be a very promising strategy.

Estrogens have been shown to be able to improve erythropoiesis (3), yet their exact effect and mechanisms of action in erythropoiesis remain unclear. In HSC, the estrogen receptor alpha (ER- α) is expressed in both females and males, and estradiol (E2) induced signaling plays a favorable role in the regulation of hematopoiesis (4). E2 has been shown to promote self-renewal and increased erythropoiesis (5). However, the cross-talk between ER and growth factors (SCF/EPO) signaling in erythropoiesis remains unclear.

Phytoestrogens are naturally occurring non-steroidal plant compounds with estrogenic-like activity. *Curcuma comosa* Roxb (*C. comosa*) exhibits an estrogen-like activity and has long been used in Thai traditional medicine for treatment of menopausal symptoms (6). It has been shown to prevent bone loss induced by estrogen deficiency in mice (7). ASPP049 ((3R)-1,7-diphenyl-(4E,6E)-4,6-heptadien-3-ol) is a diarylheptanoid extracted from *C. comosa*, it is its major component (8), and it also exerts a high estrogenic activity (9, 10). ASPP049 acts through ER- α signaling in murine osteoblastic cells (11). The estrogenic activity of ASPP049 in erythropoiesis has not yet been investigated.

We aimed to study the effects of *C. comosa* and its compound ASPP049 in the regulation of erythropoiesis.

Material and Methods.

Human CD34⁺ hematopoietic stem cells were obtained from cord blood collected according to the Helsinki Declaration with approval from the ethics committee of our institution (Comité de Protection des personnes "Ile-de-France II"). All patients gave written informed consent. For methylcellulose assays, CD34⁺ cells were culture in MethoCult™ SF H4236 (Stem Cell technologies) with IL-3 10 ng/ml and SCF 50 ng/ml as previously described (12) with various concentrations of EPO, E2 and/or ASPP049. The number of burst-forming unit-erythroid cells (BFU-E) was analyzed after 14 days.

For liquid culture, CD34⁺ cells were cultured in IMDM with human erythroid cytokines and various concentrations of EPO and ASPP 049, and counted using trypan blue exclusion. Sorted CD36⁺ cord blood cells were tested similarly.

Murine bone marrow cells were negatively sorted using the magnetic lineage cell depletion kit from Miltenyi (130-090-858). Lineage negative cells were studied following similar methods. MethoCult™ SF M3236 was used and colonies were analyzed after 7 days.

Flow cytometry. Conjugated CD34, CD36, CD71 and glycophorin A (GPA) were purchased from BD Biosciences.

Western blotting. The erythropoietin-sensitive UT7/EPO cells were starved of FBS and EPO and stimulated by SCF, EPO and/or ASPP 049. Antibodies against phospho-ERK (p44/42, Thr202/Tyr204), ERK, phospho-AKT (Ser473), AKT, phospho-STAT5 (Tyr694), STAT5, bêta-actin were from Cell Signaling technology. Antibody against EPO-R was a kind gift from Patrick Mayeux (PAB 58B).

Inhibitors. ICI 182,780 and E2 were purchased from R&D.

C57BL/6J WT mice were purchased from Envigo. Housing and experiments were performed according to the recommendations of the French Institutional Committee (A75-15-34).

Figures and statistical analyses were performed with GraphPad Prism 7.0.

Results

In combination with EPO, *C. comosa* and ASPP049 promote erythropoiesis in human and mice.

ASPP049, in combination with a sub-optimal concentration of EPO (0.05 to 0.1 UI/mL), increases the number of BFU-E colonies from human CD34⁺ cells isolated from cord blood in a colony forming cell assay, even though ASPP049 alone cannot induce the formation of BFU-E colonies (**Figure 1A**). ASPP049 can also increase the proliferation (**Figure 1B**) and differentiation toward erythroid lineage (**Figures 1C**) of CD34⁺ human cord blood cells, in combination with a sub-optimal concentration of EPO (0.1 UI/mL). These effects seem similar to what can be observed with E2. In contrast, we observed no effect of ASPP049 on proliferation (**Figure 1D**) and erythroid differentiation (**Figure 1E**) of CD36⁺ human cord blood cells.

The same effect can be obtained with mice lineage negative cells, where we found that ASPP049 can increase the number of BFU-E colonies (**Figure 1F**) and the proliferation (**Figure 1G**) of lineage negative murine bone marrow cells. We can notice that high concentrations of ASPP049 appear to be toxic (**Figures 1G**).

We then assessed whether *Curcuma comosa* could have an effect on mice erythropoiesis *in vivo*. We treated C57BL/6J 8-weeks old mice with *Curcuma comosa* (50 µg/kg/day) or placebo

IP during 7 days, and assessed the complete blood count before and after treatment. At steady state, we observed a non significant effect of *Curcuma comosa* on the erythroid lineage, restricted to young female mice (**Figure 1H**). After sub-lethal irradiation of mice, we observed a slightly faster recovery of red blood cells parameters (**Figure I**). No impact was observed on other blood cells (data not shown).

ASPP049 acts through activation of the estrogen receptor alpha, and increases EPO-induced phosphorylation of ERK, AKT and STAT5.

To determine whether ASPP049 acts through ER- α , we treated CD34+ human cord blood cells with ICI 182,780, an ER- α antagonist, prior to treatment with EPO, ASPP 049 and/or E2. We performed colony forming cell assays (**Figure 2A**) and analyzed cell proliferation (**Figure 2B and 2C**) and cell differentiation (**Figure 2D**). This antagonist abrogated both E2 and ASPP049's effect, showing that both molecules work through the ER- α .

We then thought to study the main erythroid signaling pathways: the signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5), the mitogen-activated protein kinase/extra-cellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) and the phosphoinositide-3-kinase (Pi-3K)/AKT pathways. Using the UT7/EPO cell line, we found no cooperation between ASPP049 and SCF (**Figure 2E**) but an increase in ERK and AKT phosphorylation (**Figure 2F**), and in STAT5 phosphorylation (**Figure 2G**), when a sub-optimal concentration of EPO was combined with ASPP049, as compared to EPO alone.

Discussion.

Estrogens have the potential to improve erythropoiesis, however their action is poorly known. Phytoestrogens could be an attractive alternative to estrogen, since they can have a similar action with fewer side effects. Our findings suggest that the phytoestrogen *Curcuma comosa* and its purified compound ASPP049 indeed display a positive effect on mice and human erythropoiesis, similar to the effect of the estrogen E2. These findings are in accordance with previous work on other models (11).

The effect of ASPP049 was only found in early progenitors, as no effect was seen when using the more mature CD36+ erythroid progenitors, and only in combination with EPO. These features make it an interesting candidate for correcting an early defect in erythropoiesis. Its action combined with EPO could be interesting for many situations of anemia.

In conclusion, the phytoestrogen *Curcuma comosa* and its compound ASPP049 display an estrogenic activity through the ER- α to activate JAK2/STAT5, MAPK/EKR and PI-3K/AKT pathways in erythroid cells of human and mice, increasing EPO's effects. This action results

in an increased erythropoiesis, *in vitro* and *in vivo*. *Curcuma comosa* could be used as an innovative therapeutic strategy in anemia, alone or in combination with EPO.

Acknowledgements.

This work was supported by the Ligue Nationale contre le Cancer (grant EL2015.LNCC/OIH), the Institut National Contre le Cancer (grant TRANSLA13-087), the Cancéropôle d'Ile 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 by an ATIP-Avenir grant attributed to ICM. This study was supported by grants from Laboratory of Excellence GR-Ex, reference ANR-11-LABX-0051. The Imagine Institute and the labex GR-Ex are funded by the program "Investissements d'avenir" of the French National Research Agency (references ANR-10-IAHU-01 and ANR-11-IDEX-0005-02, respectively).

G.F. is supported by Institut National du Cancer (INCA).

Authorship Contributions.

Conception and design: KB, GF, OH, IM

Conduction of experiments: KB, GF

Collection and assembly of data: KB, GF

Data analysis and interpretation: KB, GF, OH, IM

Manuscript writing: KB, GF

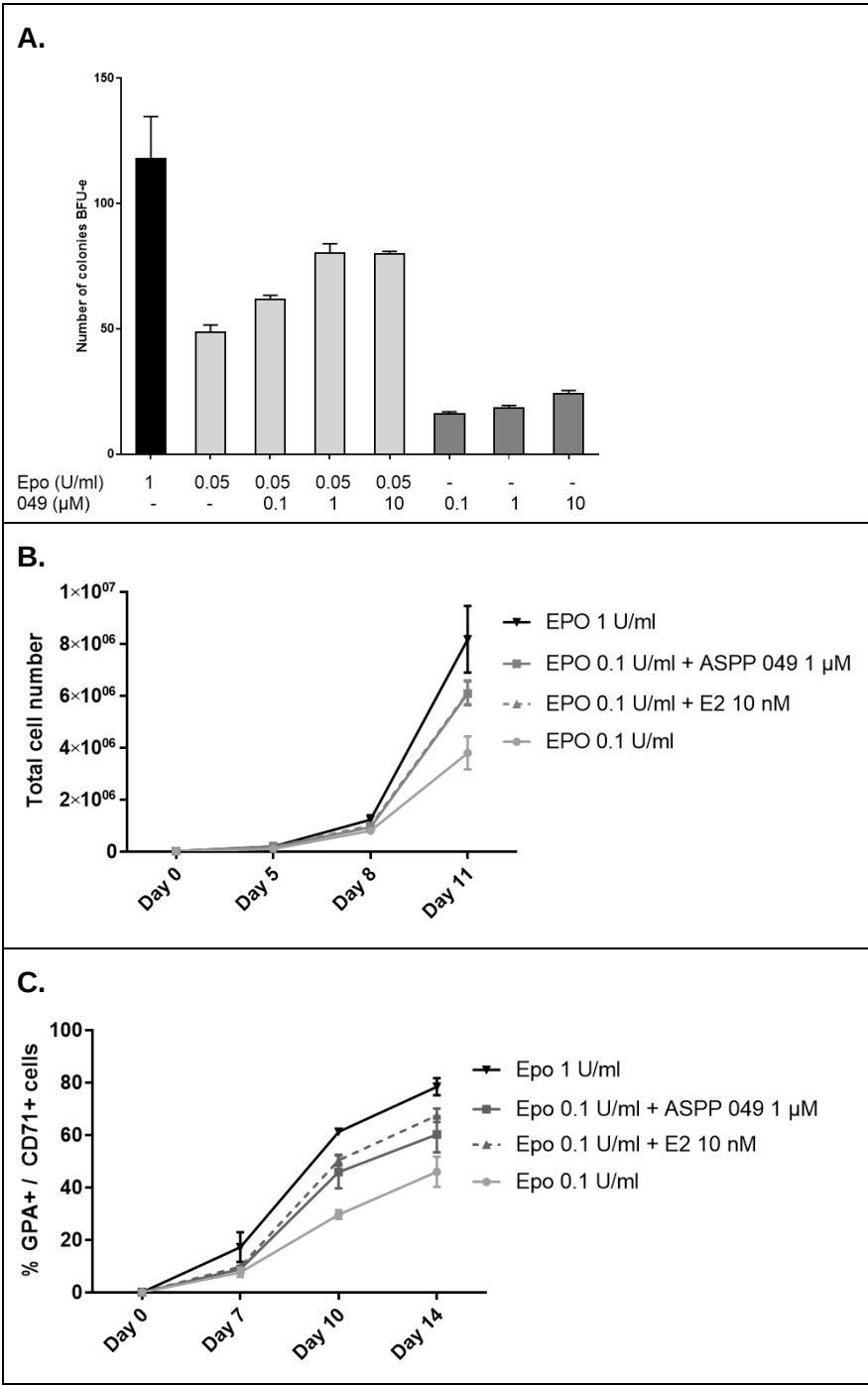
Disclosure of Conflicts of Interest.

The authors do not have any conflicts of interest to declare in relation to this work.

References.

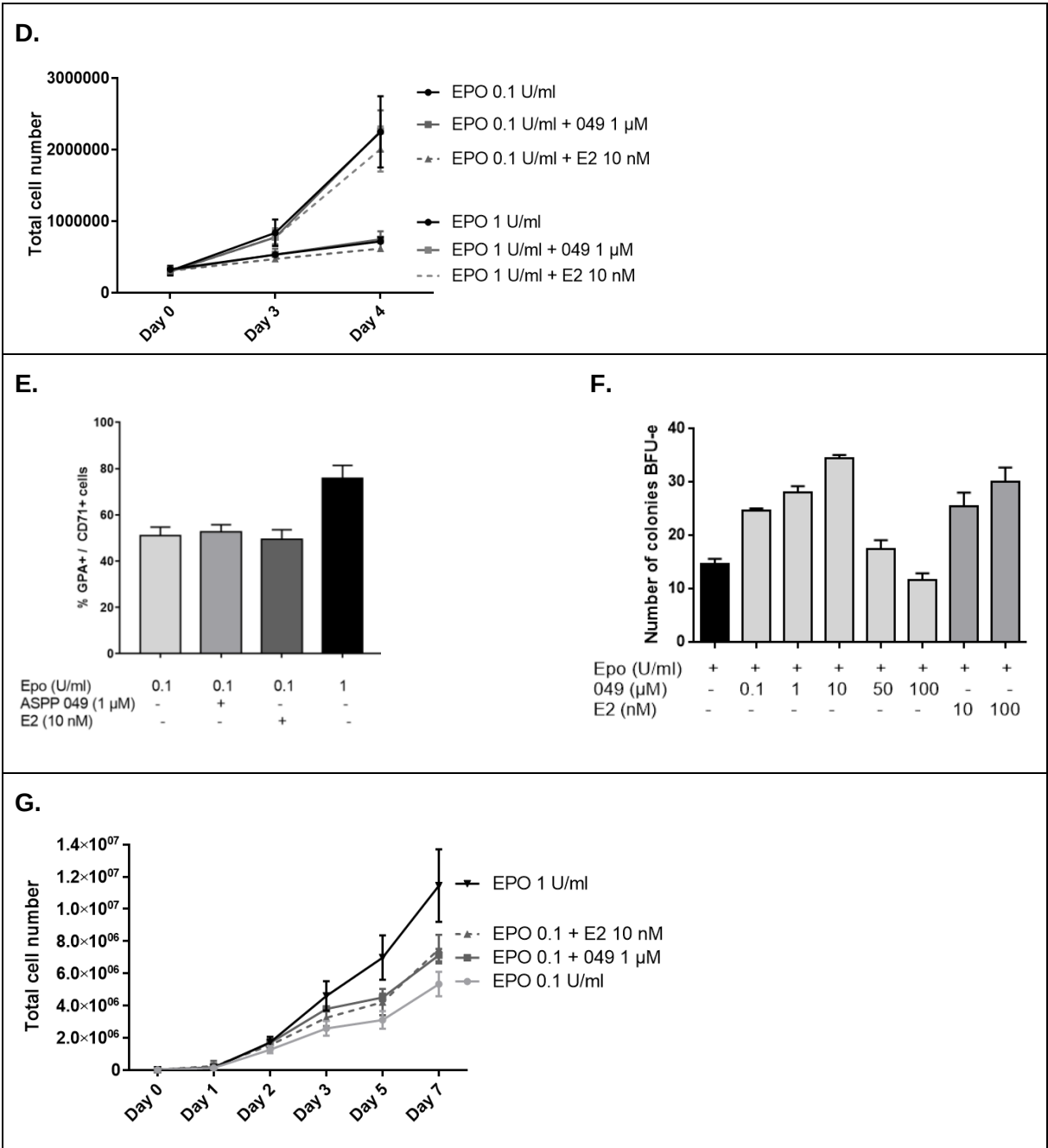
1. Goldwasser E, Krantz SB, Wang FF. Erythropoietin and erythroid differentiation. Symposium on Fundamental Cancer Research. 1984;37:103-7.
2. Goldwasser E. Characteristics and function of factors affecting erythropoiesis. Kroc Foundation series. 1984;18:355-62.
3. Kim HR, Lee JH, Heo HR, Yang SR, Ha KS, Park WS, et al. Improved hematopoietic differentiation of human pluripotent stem cells via estrogen receptor signaling pathway. *Cell & bioscience*. 2016;6(1):50.
4. Carreras E, Kovats S. Girl power: estrogen promotes HSC self-renewal. *Cell stem cell*. 2014;14(2):137-8.
5. Nakada D, Oguro H, Levi BP, Ryan N, Kitano A, Saitoh Y, et al. Oestrogen increases haematopoietic stem-cell self-renewal in females and during pregnancy. *Nature*. 2014;505(7484):555-8.
6. Piyachaturawat P, Ercharuporn S, Suksamrarn A. Estrogenic activity of *Curcuma comosa* extract in rats. *Asia Pacific Journal of Pharmacology*. 1995;10:121-6.
7. Weerachayaphorn J, Chuncharunee A, Mahagita C, Lewchalermwongse B, Suksamrarn A, Piyachaturawat P. A protective effect of *Curcuma comosa* Roxb. on bone loss in estrogen deficient mice. *Journal of ethnopharmacology*. 2011;137(2):956-62.
8. Suksamrarn A, Ponglikitmongkol M, Wongkrajang K, Chindaduang A, Kittidanairak S, Jankam A, et al. Diarylheptanoids, new phytoestrogens from the rhizomes of *Curcuma comosa*: Isolation, chemical modification and estrogenic activity evaluation. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2008;16(14):6891-902.
9. Winuthayanon W, Piyachaturawat P, Suksamrarn A, Ponglikitmongkol M, Arao Y, Hewitt SC, et al. Diarylheptanoid phytoestrogens isolated from the medicinal plant *Curcuma comosa*: biologic actions in vitro and in vivo indicate estrogen receptor-dependent mechanisms. *Environmental health perspectives*. 2009;117(7):1155-61.
10. Winuthayanon W, Suksen K, Boonchird C, Chuncharunee A, Ponglikitmongkol M, Suksamrarn A, et al. Estrogenic activity of diarylheptanoids from *Curcuma comosa* Roxb. Requires metabolic activation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(3):840-5.
11. Bhukhai K, Suksen K, Bhummaphan N, Janjorn K, Thongon N, Tantikanlayaporn D, et al. A phytoestrogen diarylheptanoid mediates estrogen receptor/Akt/glycogen synthase kinase 3 β protein-dependent activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(43):36168-78.
12. Zermati Y, Fichelson S, Valensi F, Freyssinier JM, Rouyer-Fessard P, Cramer E, et al. Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. *Experimental hematology*. 2000;28(8):885-94.

Figure 1. Effects of *C. comosa* and ASPP049 on human and mice erythropoiesis (1/3).



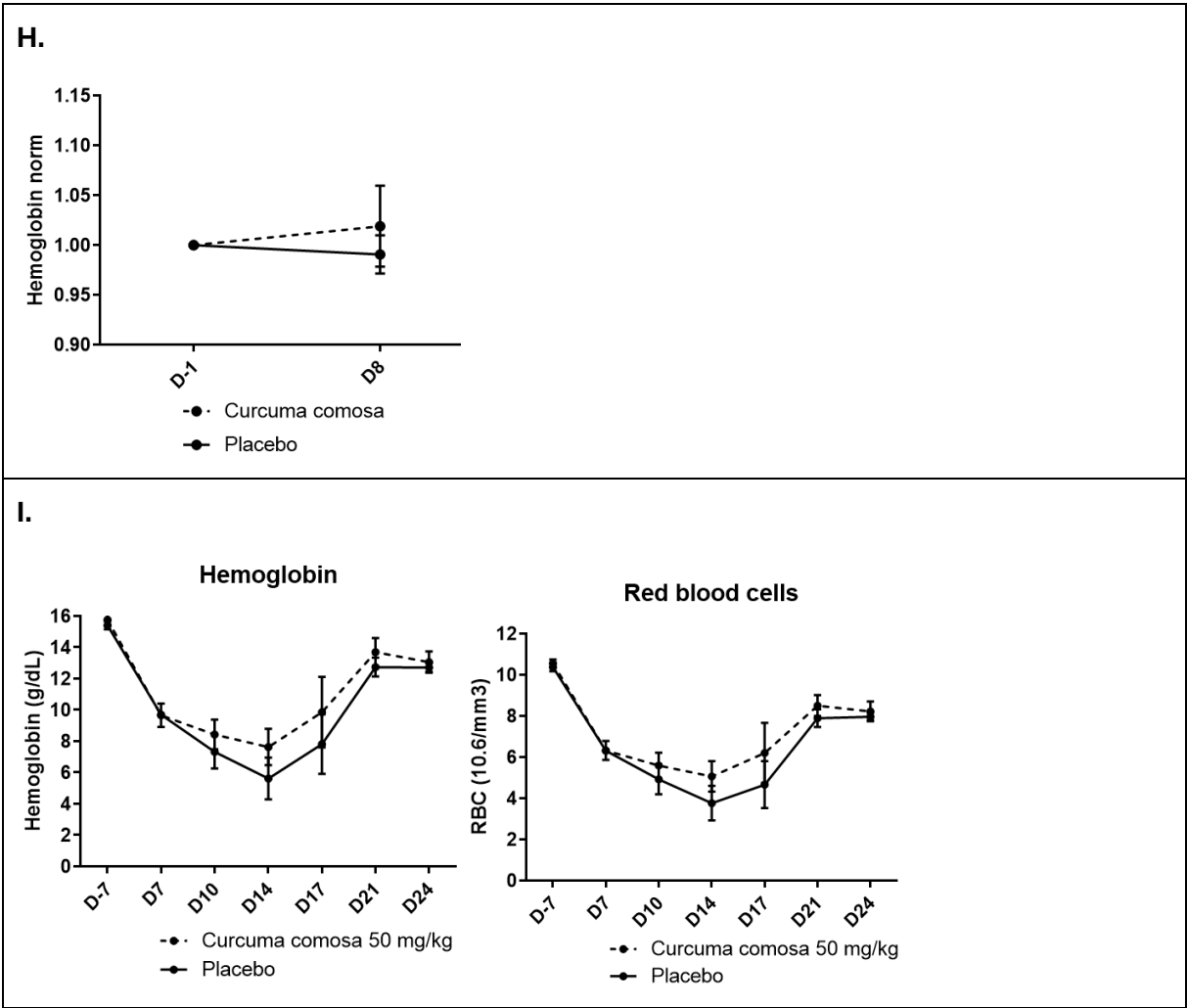
- A. Number of BFU-E colonies after 14 days of methylcellulose culture of CD34+ human cord blood cells (n=3).
- B. Proliferation of CD34+ human cord blood cells in liquid culture with EPO and/or ASPP 049 and/or E2 (n=3).
- C. Proportion of erythroid CD71+/GPA+ cells in liquid culture of CD34+ human cord blood cells (n=3).

Figure 1. Effects of *C. comosa* and ASPP049 on human and mice erythropoiesis (2/3).



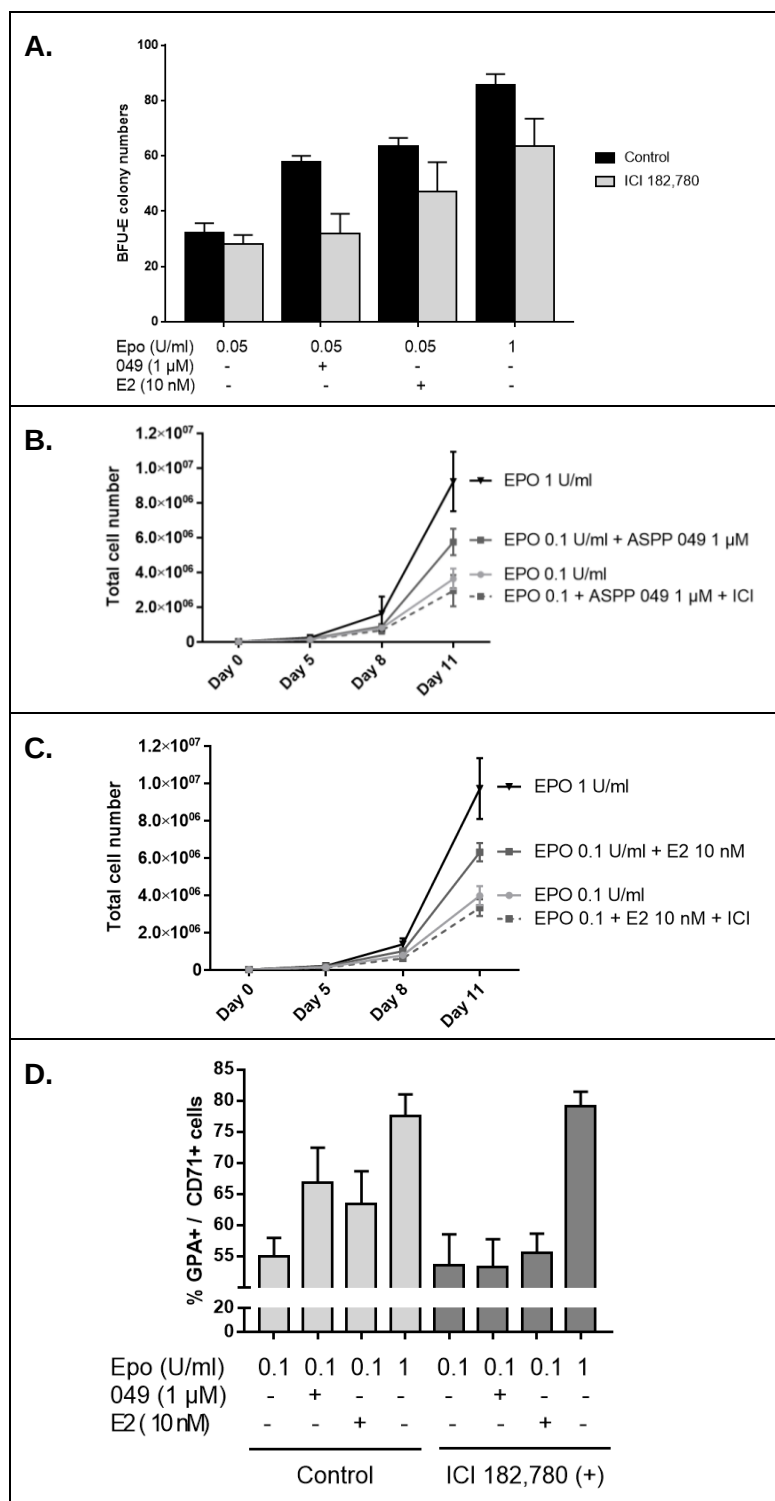
- D. Proliferation of CD36+ human cord blood cells in liquid culture with EPO and/or ASPP 049 and/or E2 (n=3).
- E. Proportion of erythroid CD71+/GPA+ cells in liquid culture of CD36+ human cord blood cells (n=3).
- F. Number of BFU-E colonies after 7 days of methylcellulose culture of mice lineage negative bone marrow cells (n=3).
- G. Proliferation of lineage negative mice bone marrow cells in liquid culture with EPO and/or ASPP 049 and/or E2 (n=3).

Figure 1. Effects of *C. comosa* and ASPP049 on human and mice erythropoiesis (3/3).



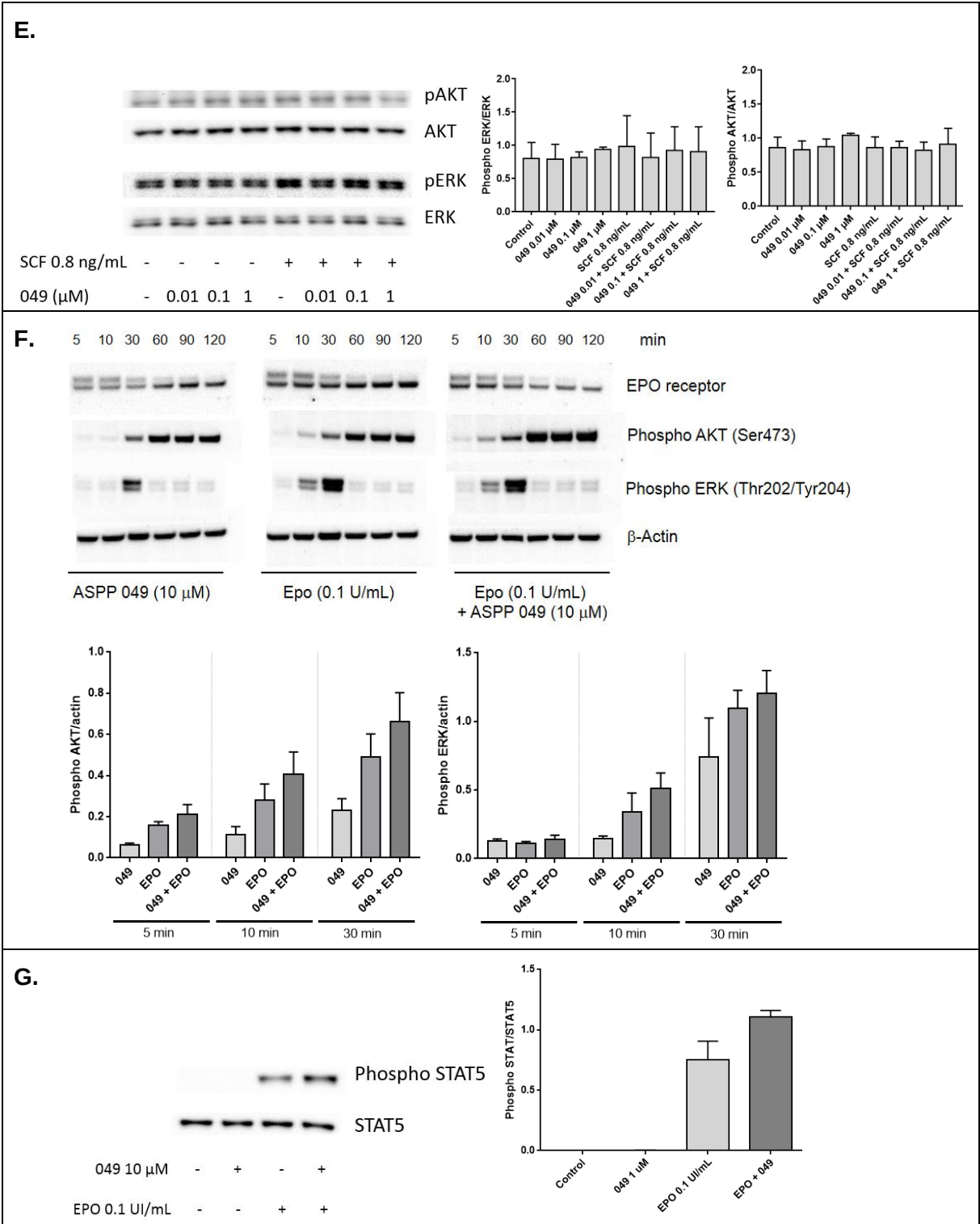
- H. Follow-up of hemoglobin after treatment of mice with *Curcuma comosa* or placebo 7 days at steady state (n=2).
- I. Follow-up of hemoglobin and red blood cells after treatment of mice with *Curcuma comosa* or placebo from day 0 to day 24 after sub-lethal irradiation (at day 0) (n=2).

Figure 2. Molecular mechanism of action of ASPP 049 (1/2).



- A. Number of BFU-E colonies after 14 days of methylcellulose culture of CD34+ human cord blood cells, in presence or absence of the ER- α antagonist ICI 182,780 (n=4).
- B. Proliferation of CD34+ human cord blood cells in liquid culture with EPO and/or ASPP 049, in presence or absence of ICI 182,780 (n=4).
- C. Proliferation of CD34+ human cord blood cells in liquid culture with EPO and/or E2, in presence or absence of ICI 182,780 (n=4).
- D. Proportion of erythroid CD71+/GPA+ cells after 7 days of liquid culture of CD34+ human cord blood cells, in presence or absence of ICI 182,780 (n=3)

Figure 2. Molecular mechanism of action of ASPP 049 (2/2).



- E. Western blot analyses of ERK and AKT phosphorylation after stimulation with SCF and/or ASPP 049 (n=2).
- F. Western blot analyses and quantification of EPO-R expression, and ERK and AKT phosphorylation, after stimulation with EPO and/or ASPP 049 (n=3).
- G. Western blot analyses and quantification of STAT5 phosphorylation after stimulation with EPO and/or ASPP 049 (n=3).

VII. Discussion

Les globules rouges, par leur rôle central dans le transport de l'oxygène, sont indispensables à la vie. L'érythropoïèse, processus aboutissant à leur production, est un système à la fois extrêmement prolifératif et extrêmement régulé – deux caractéristiques étroitement liées. Dans ce travail, nous avons voulu explorer plusieurs facteurs qui nous semblaient pouvoir jouer un rôle dans la régulation de l'érythropoïèse : la transferrine et ses récepteurs, le TfR1 et le TfR2, ainsi qu'un phytoestrogène, le *Curcuma comosa*. Nous avons choisi d'étudier ces facteurs par le biais de la signalisation érythroïde, et d'une coopération potentielle avec les deux facteurs de croissance absolument essentiels à l'érythropoïèse : le SCF et l'EPO (Goldwasser 1984, Goldwasser et al. 1984).

Rôle de l'holo-transferrine et du TfR1

Contexte

Des travaux précédents au laboratoire ont démontré que le TfR1 est un récepteur capable d'entraîner une signalisation (Coulon et al. 2011). Cette fonction de signalisation du TfR1 met en lumière un autre potentiel pour ce récepteur, jusqu'alors principalement connu pour son rôle dans l'internalisation du fer.

Dans cet article, l'activation du TfR1 induisait une activation des voies PI3K/AKT et MAPK/ERK. Ceci pouvait être déclenché par la liaison du TfR1 avec un de ses ligands : les IgA polymériques, qui étaient au centre du travail de Coulon *et al.*, un anticorps spécifique du TfR1 produit au laboratoire (A24), ou le ligand classique du TfR1 qu'est l'holo-transferrine (Coulon et al. 2011). L'activation du TfR1 par les IgA polymériques améliorait la croissance des érythroblastes différenciés à partir de cellules CD34+ humaines en conditions sous-optimales (physiologiques) d'EPO (0,1 UI/mL).

Dans la continuité de ces recherches, nous avons voulu approfondir l'étude de l'impact du TfR1 sur les voies de signalisation érythroïdes. Les trois voies de signalisation centrales dans l'érythropoïèse sont les voies STAT5, MAPK/ERK et PI3K/AKT (Hodges et al. 2007). L'activation de ces voies peut être démontrée par la phosphorylation de leurs effecteurs, nous avons donc étudié la phosphorylation de

STAT5, ERK1/2 et AKT. Ayant voulu nous concentrer principalement sur la signalisation, nous avons choisi d'utiliser la lignée érythro-mégacaryoblastique humaine UT7, dérivée d'une leucémie aiguë myéloïde de type LAM7. Dans cette lignée UT7 pluripotente, les cellules nécessitent la présence d'EPO, de GM-CSF, d'IL-3 (Komatsu et al. 1991) ou encore de TPO (Komatsu et al. 1996) pour survivre, et présentent des éléments de différenciation qui dépendent du facteur de croissance utilisé. Nous avons utilisé la lignée UT7/EPO dont les cellules présentent une différenciation érythroïde plus marquée, et sont strictement dépendantes de l'EPO (Komatsu et al. 1993). Cette lignée essentiellement érythroblastique sert fréquemment de modèle d'étude de la signalisation induite par l'EPO-R. Comme les érythroblastes humains, les cellules UT7/EPO expriment très fortement le TfR1, ce qui en faisait *a priori* également un bon modèle pour étudier la signalisation induite par le TfR1. Dans ce modèle, les cellules UT7/EPO sont tout d'abord privées de facteurs de croissance (ici, EPO et SVF) pendant une nuit, ce qui permet de mettre les cellules « au repos » et de rendre inactives les voies de signalisation étudiées. Cette déprivation va avoir pour conséquence une augmentation du nombre d'EPO-R à la surface des cellules, leur permettant d'être plus sensibles à la présence d'EPO (Hermine et al. 1992). Puisque nous voulions étudier l'effet de la transferrine, nous avons ajouté, pendant la fin de la déprivation, un agent chélateur du fer. Ensuite, les cellules peuvent être stimulées par différents facteurs pendant un temps donné, pour activer les voies de signalisation qui seront ensuite étudiées par Western Blot sur les lysats cellulaires.

Pour stimuler nos cellules, nous avons utilisé de la transferrine pour activer le TfR1, de l'EPO pour activer l'EPO-R, ainsi que du SCF pour activer le récepteur c-Kit – également présent à la surface des UT7/EPO (Broudy et al. 1998). Pour la transferrine, nous avons utilisé de l'holo-transferrine ou de l'apo-transferrine, afin de déterminer si la charge en fer de la transferrine modifiait l'activation des voies de signalisation étudiées.

Résumé des principaux résultats

Grâce à ce modèle, nous avons pu montrer de façon reproductible une coopération entre l'holo-transferrine et l'EPO dans les cellules UT7/EPO, sur la phosphorylation de ERK, AKT, mais également STAT5. Cette coopération était maintenue dans le temps. Elle était retrouvée plus fortement avec l'holo-transferrine qu'avec l'apo-transferrine, en sachant que cette dernière a une affinité moins forte pour

le TfR1. Elle était surtout visible à des concentrations sous-optimales, physiologiques, d'holo-transferrine et d'EPO. A plus fortes concentrations d'EPO, la coopération n'était plus visible en Western Blot, cependant elle semblait maintenue lors de l'analyse plus sensible réalisée en Nanopro. L'holo-transferrine avait très peu d'effet sur la phosphorylation de ERK, AKT et STAT5 lorsqu'elle était utilisée seule, même à très fortes doses. Il semble donc que l'holo-transferrine agisse comme un facteur potentialisateur de l'activation par l'EPO des voies de signalisation liées à l'EPO-R. L'holo-transferrine pourrait donc sensibiliser les érythroblastes à l'EPO, ayant pour conséquence de majorer leur réponse à l'EPO.

Dans la moelle osseuse, le niveau d'EPO est sous-optimal (Koury and Bondurant 1990). Le modèle actuellement admis est un modèle où les progéniteurs érythroïdes ont un seuil de sensibilité à l'EPO variable, et où leur survie dépend donc de leur sensibilité à l'action de l'EPO (Kelley et al. 1993). Certains progéniteurs, très sensibles à l'EPO, pourraient donc survivre même à de faibles taux d'EPO, tandis que les autres, moins sensibles, ne pourraient survivre qu'en cas d'augmentation des taux d'EPO – dans le cadre d'un stress hématopoïétique par exemple (Courtois et al. 2007). Cependant, les facteurs responsables de la sensibilité des progéniteurs érythroïdes à l'EPO sont mal connus. L'holo-transferrine pourrait ainsi amplifier l'activation des voies de signalisation érythroïdes induites par la liaison de l'EPO à l'EPO-R et favoriser la survie des érythroblastes. Cette hypersensibilité à l'EPO induite par l'holo-transferrine pourrait s'expliquer en partie par l'augmentation du nombre de récepteurs à l'EPO dans les cellules, mais pourrait également passer par l'activation de la signalisation induite par le TfR1.

Cette coopération entre le TfR1 et d'autres récepteurs aux cytokines pourrait être retrouvée dans d'autres types cellulaires : nous avons en effet observé une coopération entre holo-transferrine et IL-2 dans une lignée de lymphocytes T dépendants de l'IL-2, KIT225. Dans ce modèle également, l'holo-transferrine avait très peu d'impact seule, mais semblait potentialiser l'activation des voies de signalisation induites par la liaison de l'IL-2 à son récepteur. Cette amplification du signal de l'IL-2 était aussi essentiellement observée à de faibles concentrations d'IL-2. Même si cette coopération semblait moins importante que celle observée dans les érythroblastes, cela pourrait signer un mode de fonctionnement du TfR1 commun à plusieurs types cellulaires.

Limites

Dans ce travail, nous n'avons pas établi avec certitude que l'effet observé après stimulation par l'holo-transferrine était bien lié à sa fixation sur le TfR1. Cependant, dans notre modèle de déprivation des cellules, nous avons observé une phosphorylation quasi-nulle de ERK, AKT et STAT5 dans nos conditions contrôle. La phosphorylation observée dans les autres conditions semble donc bien liée aux traitements ajoutés, dont l'holo-transferrine. Celle-ci peut se lier au TfR1 ou au TfR2, mais elle a une affinité 25 fois plus forte pour le TfR1 que pour le TfR2, et les UT7/EPO expriment très fortement le TfR1. On peut donc supposer que l'effet observé est en majorité lié à la fixation de l'holo-transferrine sur le TfR1.

Ensuite, cet effet pourrait être lié à l'internalisation du fer plutôt qu'à une fonction de signalisation induite par le TfR1. L'entrée du fer est en effet très rapide, puisqu'il est estimé que la transferrine est endocytée par le TfR1 avec une demi-vie de 3,5 minutes. Le fer reste ensuite dans la cellule, et l'apo-transferrine libérée de son fer est sécrétée dans le milieu extérieur avec une demi-vie de 5 minutes. Il a été estimé que chaque molécule de TfR1 fixait un nouveau ligand toutes les 15,8 minutes, effectuant donc un cycle complet d'internalisation et de recyclage entre deux ligands (Ciechanover et al. 1983). Ainsi, même si nous avons observé une coopération entre holo-transferrine et EPO à seulement quelques minutes de traitement, nous ne pouvions pas exclure un rôle de l'endocytose du fer. Nous avons donc réalisé les mêmes expériences de déprivation et de stimulation de nos cellules UT7/EPO en présence d'un inhibiteur de l'endocytose : le dynasore. Le dynasore est un inhibiteur de l'activité de la dynamine, qui est elle-même essentielle à l'endocytose dépendante des clathrines (Macia et al. 2006). Après avoir confirmé que le dynasore permettait bien de bloquer l'endocytose du TfR1, qui est une endocytose dépendante des clathrines, nous avons pu vérifier que la coopération observée entre holo-transferrine et EPO sur les phosphorylations de ERK, AKT et STAT5 était bien conservée en l'absence d'endocytose – même si, de façon attendue, les phosphorylations étaient moins intenses qu'en l'absence de dynasore dans toutes nos conditions.

Par ailleurs, nos travaux sur la signalisation ont été réalisés sur une lignée cellulaire, afin de pouvoir étudier de nombreuses conditions sur un nombre suffisant de cellules. Même si la lignée UT7/EPO est un modèle reconnu pour l'étude de la signalisation induite par l'EPO-R dans les érythroblastes humains, il serait intéressant de valider nos observations sur des érythroblastes primaires.

Nous avons également souhaité explorer l'hypothèse d'un complexe protéique regroupant notamment le TfR1 et l'EPO-R. Comme mentionné dans la partie résultats, nous avons été confrontés à des problèmes techniques rendant difficile l'interprétation de nos données, nous empêchant d'apporter une réponse claire à cette question.

Enfin, nous avons voulu savoir si nos résultats sur la signalisation pouvaient entraîner un bénéfice biologique sur le plan cellulaire, et nous avons donc étudié la survie et la prolifération des cellules UT7 en culture, avec ou sans EPO et/ou holo-transferrine. Nous avons observé un petit bénéfice en survie avec l'holo-transferrine, cependant cet effet peut être simplement lié à l'apport en fer dans les cellules, un traitement continu par dynasore pour bloquer l'endocytose étant trop toxique. Ainsi, la présence d'holo-transferrine dans le milieu est de toute façon bénéfique pour les cellules, mais il est difficile de distinguer le bénéfice apporté par l'entrée de fer du bénéfice apporté par la signalisation du TfR1.

Conclusion et perspectives

Malgré ces limites, nos travaux ont permis de démontrer que l'holo-transferrine peut potentialiser la signalisation induite par l'EPO dans les cellules érythroïdes, indépendamment de l'endocytose du TfR1, et de suggérer que cette fonction de coopération de l'holo-transferrine existe également avec d'autres récepteurs aux cytokines dans d'autres types cellulaires.

La coopération entre fer et EPO est connue depuis longtemps, démontrée principalement sur le plan clinique (Goodnough et al. 2000). Ainsi, il a été montré que les patients présentant une anémie post-chimiothérapie pour un cancer répondent mieux à l'EPO s'ils sont supplémentés en fer (Auerbach et al. 2004), même en l'absence de carence martiale (Mafodda et al. 2017). Pendant un traitement par EPO, il existe en effet un état de carence martiale relative dans lequel les besoins accrus en fer pour l'érythropoïèse dépassent l'apport disponible en fer, même lorsqu'il existe des réserves en fer dans l'organisme (Brugnara et al. 1993) et malgré un accroissement de l'absorption intestinale du fer (Skikne and Cook 1992). Une supplémentation en fer peut donc permettre de réduire les doses d'EPO utilisées (Fishbane et al. 1995, Besarab and Dalton 2001). Ces observations sont probablement principalement liées à l'entrée du fer dans les cellules érythroïdes pour la synthèse d'hémoglobine.

Or, une supplémentation en fer peut avoir des effets secondaires négatifs. D'une part, et malgré d'importants progrès, ce traitement pose des problèmes de tolérance (Girelli et al. 2018). La supplémentation peut être administrée par voie orale, mais elle s'accompagne fréquemment d'effets indésirables digestifs : douleurs abdominales, nausées, vomissements, diarrhée, constipation...(Cancelo-Hidalgo et al. 2013, Tolkien et al. 2015). Ces symptômes sont souvent responsables d'une faible observance du traitement. De plus, un autre effet négatif de la supplémentation en fer par voie orale, qui a longtemps été négligé, est une altération du microbiome intestinal liée à la présence de fer non absorbé au niveau du colon (Kortman et al. 2014, Paganini and Zimmermann 2017). Ce fer pourrait être favorable à la croissance de certaines souches de bactéries pathogènes dépendantes du fer, au détriment des bactéries commensales (Jaeggi et al. 2015). Le fer peut aussi être administré par voie intra-veineuse, mais qui, elle, est associée à un risque de réactions d'hypersensibilité parfois graves. L'administration par voie intra-veineuse est donc réservée aux situations dans lesquelles la voie orale n'est pas efficace ou ne peut pas être utilisée, et peut être réalisée uniquement dans un établissement de santé. D'autre part, quelle que soit la voie utilisée, un excès de fer peut être toxique pour les organes : il faut donc être sûr que le fer administré soit disponible et utilisé pour l'érythropoïèse, et qu'il n'y ait pas de risque qu'il s'accumule dans d'autres organes. Une quantité trop importante de fer peut entraîner une surcharge d'organe en parallèle de l'amélioration de l'érythropoïèse (Fishbane et al. 1995). Il peut également exister des situations de carence martiale fonctionnelle, dans lesquelles une anémie persiste malgré l'accroissement des réserves en fer (Tarng et al. 1999) – ceci pouvant être partiellement corrigé par la vitamine C, qui semble faciliter la libération du fer des réserves et son utilisation par les cellules érythroïdes (Tarng et al. 1999).

Cependant, nous avons montré que la coopération entre fer et EPO existe aussi au niveau moléculaire sur les voies de signalisation érythroïdes, indépendante de l'endocytose du fer mais activée par la présence d'un ligand du TfR1. Il y aurait donc probablement un intérêt à stimuler le TfR1 avec un de ses ligands, afin d'amplifier la signalisation érythroïde et d'améliorer les réponses à l'EPO indépendamment de l'entrée du fer.

Ainsi, l'holo-transferrine (ou un autre ligand du TfR1) pourrait être utilisée pour corriger des situations d'anémie.

La bêta-thalassémie est une cause importante d'anémie chronique. Il s'agit d'une pathologie de l'érythropoïèse résultant d'une mutation du gène de la bêta-globine, responsable d'un défaut de synthèse d'hémoglobine (Taher et al. 2018). Ceci entraîne une érythropoïèse inefficace dans laquelle on observe une expansion des progéniteurs érythroïdes précoces, mais une maturation des érythroblastes déficiente (Libani et al. 2008) en raison de l'apoptose de ces progéniteurs (Mathias et al. 2000), et une anémie microcytaire. En réponse à cette anémie, les taux d'EPO sont élevés dans la bêta-thalassémie, mais ne suffisent pas à corriger l'érythropoïèse inefficace. De plus, en raison de l'expansion du pool de progéniteurs précoces, l'érythroferrone, le régulateur érythroïde de l'homéostasie du fer, supprime l'hepcidine et provoque une surcharge en fer (Kautz et al. 2015), qui sera potentiellement aggravée par les transfusions de globules rouges. Les complications de cette surcharge en fer sont principalement causées par le fer libre sérique, qui est toxique, alors que l'érythropoïèse dépend de l'absorption du fer lié à la transferrine via le TfR1.

Dans un modèle murin de bêta-thalassémie intermédiaire ($Hbb^{th1/th1}$), il a été montré qu'une supplémentation en fer permettait d'améliorer l'érythropoïèse extra-médullaire, mais non médullaire (Ginzburg et al. 2009). Formulant l'hypothèse que ceci pourrait être expliqué par un défaut de transport du fer, les auteurs ont testé sur ce même modèle murin un traitement par transferrine. Ils ont pu montrer qu'un traitement par transferrine permettait d'améliorer voire de corriger l'anémie : chez ces souris, les injections de transferrine entraînaient une normalisation de la survie des globules rouges et une augmentation de la production d'hémoglobine avec diminution de la réticulocytose, une normalisation des concentrations de fer libre sérique, une augmentation d'expression de l'hepcidine, une diminution des taux d'EPO et de la splénomégalie. Ces résultats indiquent qu'un traitement par transferrine pourrait être bénéfique dans la bêta-thalassémie (Li et al. 2010).

Par extension, un traitement par transferrine pourrait être intéressant dans d'autres situations d'anémie chez l'homme, notamment pour les patients répondant peu ou pas à l'EPO – par exemple chez des patients atteints de syndrome myélodysplasique ou d'insuffisance rénale chronique. Un tel traitement pourrait également être utilisé en complément d'une supplémentation martiale, permettant alors peut-être de réduire à la fois les doses d'EPO et les quantités de fer utilisées. Ce type de stratégie est prometteur, ce d'autant que l'innocuité des injections de

transferrine humaine a déjà été démontrée (Parkkinen et al. 2006).

Puisque nos résultats suggèrent que cette fonction de la transferrine serait applicable à d'autres types cellulaires, on peut aussi imaginer que le TfR1 puisse être ciblé dans d'autres contextes cliniques et notamment en immunologie, seul ou en association avec des cytokines.

Rôle du TfR2

Contexte

Après avoir constaté une coopération entre l'holo-transferrine et l'EPO, et en supposant que cette coopération passait par une liaison de l'holo-transferrine au TfR1, nous avons voulu déterminer s'il existait une interaction entre TfR1 et EPO-R. Cette interaction avait été recherchée par d'autres équipes mais n'avait jamais été retrouvée. De notre côté, nos travaux ne nous ont pas permis de répondre à cette question en raison de difficultés techniques. Cependant, au cours de notre réflexion, nous avons fait l'hypothèse que l'interaction entre TfR1 et EPO-R pouvait être indirecte, et impliquer notamment le TfR2. En effet, des interactions entre TfR1 et TfR2 ont déjà été décrites, au moins sous forme d'hétérodimères (Vogt et al. 2003) et il a été démontré que le TfR2 était un partenaire de l'EPO-R (Forejtnikova et al. 2010). Nous avons donc voulu retirer le TfR2 de nos cellules, dans l'idée que l'interaction entre TfR1 et EPO-R serait perdue dans cette condition. Nous avons donc réalisé un KO du TfR2 par la méthode d'édition du génome CRISPR/Cas9, avec l'aide de Carine Lefèvre dans le cadre de la plateforme CRISPR du GR-Ex.

Résumé des principaux résultats

Sur le plan du complexe protéique, nous n'avons pas réussi à répondre à notre question initiale en raison de difficultés techniques. En revanche, nous avons observé des effets intéressants sur le plan de l'expression de l'EPO-R ainsi que de la signalisation induite par l'EPO.

Nous avons tout d'abord étudié la signalisation induite par l'EPO dans nos cellules UT7/EPO WT et KO pour le TfR2, déprivées puis stimulées par EPO et holo-transferrine. Nous avons constaté une phosphorylation plus intense de ERK, AKT et STAT5 dans nos cellules KO par rapport aux WT. Cette observation était en lien avec une expression plus importante de l'EPO-R sur le plan protéique dans nos cellules KO pour le TfR2 par rapport aux WT. Dans ces cellules KO, il semblait cependant que la coopération entre holo-transferrine et EPO soit perdue, puisque nous n'observions pas d'effet de l'ajout d'holo-transferrine à l'EPO à faible concentration – contrairement à ce que nous avons mis en évidence avec les cellules WT.

Ces résultats suggèrent que le TfR2 agisse comme un régulateur négatif de l'expression ainsi que de la signalisation de l'EPO-R, puisque ces deux paramètres

semblaient augmenter en l'absence du TfR2. L'holo-transferrine paraissait capable de surmonter cette inhibition induite par le TfR2. Nous avons donc voulu savoir si l'holo-transferrine permettait d'augmenter l'expression du TfR2, mais nous n'avons observé aucune modification de l'expression protéique du TfR2 après traitement par holo-transferrine, même à forte concentration. Dans la littérature, certaines études retrouvent une augmentation de l'expression protéique du TfR2, sans modification du niveau d'ARN messager, dans des hépatocytes stimulés avec des concentrations croissantes d'holo-transferrine (Johnson and Enns 2004, Robb and Wessling-Resnick 2004). Cependant, l'holo-transferrine n'avait pas d'impact sur l'expression du TfR2 dans d'autres lignées cellulaires transfectées avec du TfR2 telles que les cellules HeLa (dérivées d'un cancer de l'utérus) et HEK 293T (cellules tumorales provenant de cellules embryonnaires de reins humains), ni dans la lignée K562 dérivée d'une érythroleucémie et exprimant le TfR2 de façon endogène (Robb and Wessling-Resnick 2004). Il a donc été suggéré que la régulation de l'expression du TfR2 par l'holo-transferrine soit spécifique aux cellules hépatiques (Deaglio et al. 2002, Robb and Wessling-Resnick 2004). Ainsi, dans les cellules érythroïdes humaines et murines, il ne semble pas exister de régulation de l'expression du TfR2 par la transferrine (Kawabata et al. 1999, Kawabata et al. 2000, Kawabata et al. 2001), ce qui est compatible avec nos résultats. Néanmoins, cette question n'est pas parfaitement élucidée puisque Pagani *et al.* ont retrouvé au contraire une augmentation significative de l'expression du TfR2 à la surface cellulaire en présence d'holo-transferrine, dans la lignée HeLa transfectée avec du TfR2, dans la lignée érythroïde UT7 et dans des érythroblastes humains (Pagani et al. 2015).

En nous basant sur nos résultats, notre prochaine hypothèse était donc que l'holo-transferrine n'interfère pas avec l'expression du TfR2 mais avec sa fonction. Ayant observé une augmentation de l'expression et de la signalisation de l'EPO-R en l'absence de TfR2, nous avons supposé que le TfR2 inhibe la signalisation de l'EPO-R par une régulation négative de son expression protéique. La régulation négative de l'EPO-R implique notamment sa dégradation par le protéasome (Walrafen et al. 2005). Ainsi, l'interaction entre TfR2 et EPO-R pourrait favoriser la dégradation de l'EPO-R par le protéasome, dégradation qui pourrait être inhibée par la présence d'holo-transferrine. Pour explorer cette hypothèse, nous avons tout d'abord stimulé nos cellules UT7/EPO WT avec des concentrations croissantes d'holo-transferrine, et nous

avons observé une augmentation de l'expression protéique de l'EPO-R, augmentation qui n'était pas retrouvée en présence d'un inhibiteur du protéasome, le MG132. La présence d'holo-transferrine pourrait donc protéger l'EPO-R de sa dégradation par le protéasome. En revanche, dans nos cellules KO pour le TfR2, nous n'avons pas retrouvé d'impact de l'holo-transferrine sur l'expression de l'EPO-R, qui était plus élevée à l'état de base dans ces cellules. La présence d'un inhibiteur du protéasome semblait cependant garder un impact dans nos cellules TfR2 KO en augmentant encore l'expression de l'EPO-R. Ainsi, le TfR2 pourrait avoir pour rôle de réguler négativement la signalisation de l'EPO-R en favorisant sa dégradation par le protéasome, rôle qui serait inhibé de façon dose-dépendante par l'holo-transferrine – directement ou via sa liaison au TfR1.

Limites

Nos résultats sont en faveur d'une régulation négative de l'érythropoïèse par le TfR2, ce qui n'est en accord qu'avec certaines données de la littérature.

La fonction érythroïde du TfR2 est difficile à étudier, puisque son rôle principal est de participer à l'homéostasie du fer via la régulation de la production d'hepcidine. Ainsi, l'inactivation du TfR2 dans des modèles murins, comme la présence d'une mutation du TfR2 chez l'homme, ont pour principale conséquence l'apparition d'une hémochromatose (Fleming et al. 2002, Kawabata et al. 2005, Wallace et al. 2005, Wallace et al. 2007, Corradini et al. 2011). Le phénotype est alors dominé par une surcharge martiale avec une hepcidine basse, sans perturbation hématologique notable – du moins à l'âge adulte, puisque certains modèles murins retrouvaient une anémie transitoire chez des souris jeunes (Roetto et al. 2010).

Puis Forejtnikova *et al.* ont montré que le TfR2 est un partenaire du récepteur à l'EPO, favorisant sa maturation et son expression à la surface (Forejtnikova et al. 2010). *In vivo* chez des souris TfR2^{-/-}, comme dans les études précédentes, les paramètres hématologiques n'étaient pas significativement différents de ceux des souris WT. Cependant, *in vitro*, les progéniteurs érythroïdes des souris déficientes en TfR2^{-/-} étaient moins sensibles à l'EPO – ce qui était en fait compensé *in vivo* par une augmentation des taux d'EPO circulants (Forejtnikova et al. 2010). De même, l'absence de TfR2 dans des précurseurs érythroïdes humains entraînait un retard de différenciation, avec retard d'hémoglobinisation des progéniteurs érythroïdes s'accompagnant d'une légère augmentation du nombre total de cellules en culture

(Forejtnikova et al. 2010).

Plusieurs modèles ont ensuite été développés afin d'étudier plus particulièrement le rôle érythroïde du TfR2, en utilisant un contexte de carence martiale pour le démasquer et/ou en réalisant une délétion du TfR2 spécifiquement au niveau de la moelle osseuse (Lee et al. 2012, Nai et al. 2014, Nai et al. 2015, Wallace et al. 2015, Rishi et al. 2016, Pellegrino et al. 2017, Artuso et al. 2018). Selon les modèles, l'inactivation du TfR2 n'a pas les mêmes conséquences sur les paramètres hématologiques des souris.

Certains modèles utilisent l'inactivation de *Tmprss6*, principal inhibiteur de l'hepcidine, pour provoquer une carence martiale liée à une hepcidine élevée. Dans ces modèles, l'absence de TfR2 entraîne une érythropoïèse inefficace avec augmentation du nombre de globules rouges, mais une microcytose et une diminution de l'hémoglobine (Lee et al. 2012, Nai et al. 2014, Wallace et al. 2015). Le TfR2 pourrait donc être considéré comme un senseur du fer qui agirait comme un facteur limitant pour l'érythropoïèse : ainsi, il permettrait de limiter la production de globules rouges particulièrement en cas de carence martiale, pour éviter une microcytose trop importante lorsque l'hémoglobination est limitée par le manque de fer. A noter que dans ces modèles, les taux circulants d'EPO sont normaux ou bas, ce qui suggérerait plutôt une augmentation de la sensibilité des progéniteurs érythroïdes TfR2^{-/-} à l'EPO. Ce mécanisme pourrait impliquer le récepteur à l'EPO, mais n'est pas encore bien compris.

En conditions normales, le TfR2 pourrait également servir à éviter une érythropoïèse excessive. Cependant, l'absence de TfR2 seule entraîne une surcharge en fer qui masque probablement cette fonction érythroïde, puisque l'augmentation de la disponibilité du fer a tendance à augmenter l'hémoglobine, le volume globulaire total et la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (Silvestri et al. 2014). Certains modèles de souris TfR2^{-/-} avec surcharge martiale retrouvent en effet une augmentation de l'érythropoïèse chez les souris jeunes, mais pas chez les souris adultes qui présentent des paramètres hématologiques normaux en dehors d'une macrocytose, d'une augmentation de la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine, et une accumulation de progéniteurs érythroïdes immatures dans la moelle associée à une augmentation de l'apoptose des précurseurs tardifs (Pellegrino et al. 2017).

Afin de mieux comprendre le rôle hématopoïétique du TfR2, Nai et al. ont

développé un modèle de souris dépourvues de TfR2 spécifiquement dans la moelle osseuse, obtenues par greffe de moelle de souris TfR^{-/-} dans des souris WT irradiées (Nai et al. 2015). Ces souris présentent des taux d'hémoglobine plus élevés que les souris WT, avec une augmentation des cellules érythroïdes nucléées dans la moelle et des globules rouges matures dans le sang. Cette augmentation est liée à un niveau d'apoptose plus faible de ces cellules dans les souris KO par rapport aux WT, indépendamment des concentrations d'EPO, similaires dans les deux modèles de souris. Les souris déficientes en TfR2 au niveau de la moelle présentent une augmentation de l'expression des gènes cibles de l'EPO, suggérant une augmentation de la signalisation induite par l'EPO-R impliquant notamment les voies STAT5 et PI3K/AKT (Nai et al. 2015, Artuso et al. 2018). Les auteurs suggèrent donc que le TfR2 puisse réguler négativement la sensibilité des érythroblastes à l'EPO (Nai et al. 2015), hypothèse compatible avec nos résultats. Cependant, dans un autre modèle utilisant des souris Tfr2 floxées croisées avec des souris Vav-Cre pour déléter le TfR2 spécifiquement dans les cellules hématopoïétiques, les auteurs retrouvent un blocage de la différenciation érythroïde avec accumulation d'érythroblastes immatures et diminution des cellules matures dans la moelle et la rate (Rishi et al. 2016). Ils concluent donc que le TfR2 est un régulateur positif de l'érythropoïèse, et que sa présence est nécessaire à une érythropoïèse efficace, particulièrement en cas de carence martiale. Ces différences pourraient être expliquées par le modèle utilisé. Il est possible que les cellules médullaires des souris TfR2^{-/-}, ayant été exposées à une surcharge martiale avant d'être greffées, aient développé des mécanismes de régulation différents. De plus, même si les deux modèles utilisaient une carence martiale induite par l'alimentation, la carence obtenue était plus sévère dans le deuxième modèle (Rishi et al. 2016) que dans le premier (Nai et al. 2015).

Malgré les différences observées entre tous ces modèles, il semble bien établi que le TfR2 a un rôle dans l'érythropoïèse indépendant de son rôle dans l'homéostasie du fer. Ces deux rôles du TfR2 restent cependant difficiles à dissocier, l'érythropoïèse étant elle-même étroitement liée à l'homéostasie du fer. De plus, le rôle du TfR2 dans l'érythropoïèse est discret en conditions normales, et il semble nécessaire d'induire une carence martiale pour le démasquer, la profondeur et le mécanisme de la carence martiale ayant alors sans doute un impact différent sur la réponse érythroïde observée. Enfin, il est possible que le TfR2 n'ait pas la même fonction en fonction du stade de

maturation des cellules érythroïdes, sachant que ces mêmes cellules peuvent être préférentiellement orientées soit vers la prolifération, soit vers la différenciation, en fonction de leur stade. Ainsi, le rôle érythropoïétique du TfR2 n'est pas encore entièrement compris.

Dans notre travail, nous avons uniquement travaillé sur une lignée cellulaire, ce qui peut limiter la validité de nos hypothèses. Nos résultats seraient donc intéressants à confirmer dans une autre lignée érythroïde, ainsi que sur des érythroblastes primaires humains. Il pourrait également être intéressant de ré-exprimer le TfR2 dans nos cellules, pour vérifier que cela annule bien les effets du CRISPR.

De plus, le mécanisme par lequel le TfR2 exercerait son rôle de régulation négative de l'EPO-R n'est pas parfaitement élucidé. Nous avons supposé qu'une partie de cette action impliquerait le protéasome, mais des expériences complémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Après stimulation par l'EPO, le nombre d'EPO-R à la surface cellulaire diminue fortement en raison d'une internalisation et d'une dégradation des complexes EPO/EPO-R. En présence d'un inhibiteur du protéasome, l'internalisation a toujours lieu mais des récepteurs à l'EPO nouvellement synthétisés les remplacent immédiatement, permettant l'activation prolongée de la voie de l'EPO-R (Verdier et al. 2000). Cependant, l'inhibition du protéasome ne protège que partiellement l'EPO-R de la dégradation, et il a été montré que l'EPO-R peut également être dégradé par une autre voie impliquant les lysosomes (Walrafen et al. 2005). A noter que le MG132, que nous avons utilisé, n'est pas spécifique du protéasome mais inhibe également les lysosomes. Globalement, l'existence d'une régulation de l'EPO-R par le TfR2 et le rôle du protéasome et/ou des lysosomes dans cette régulation sont des questions qui restent à explorer.

Même si nous avons des données suggérant que l'absence du TfR2 puisse améliorer la survie des cellules et leur sensibilité à l'EPO en culture, l'effet biologique résultant de l'absence du TfR2 est exploré de façon incomplète dans notre travail, et devrait être étudié de façon plus approfondie dans un autre modèle.

Conclusion

Malgré ces limites, le TfR2 semble être un acteur important dans la régulation de l'érythropoïèse, et pourrait donc être une cible intéressante dans la prise en charge des pathologies impliquant des perturbations de l'érythropoïèse. Notre hypothèse est

présentée **Figure 30** : nos données suggèrent que le TfR2 est un régulateur négatif de la signalisation de l'EPO-R, alors que l'holo-transferrine est un régulateur positif – à condition que le TfR2 soit présent. L'holo-transferrine pourrait agir soit via sa liaison au TfR1, soit directement par une interaction avec le TfR2, et permettrait de lever l'inhibition de l'EPO-R induite par le TfR2. La régulation négative induite par le TfR2 passerait, au moins en partie, par un adressage de l'EPO-R vers une dégradation par le protéasome.

Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces hypothèses et notamment pour mieux comprendre le rôle du TfR2, et son impact sur les voies de signalisation de l'érythropoïèse.

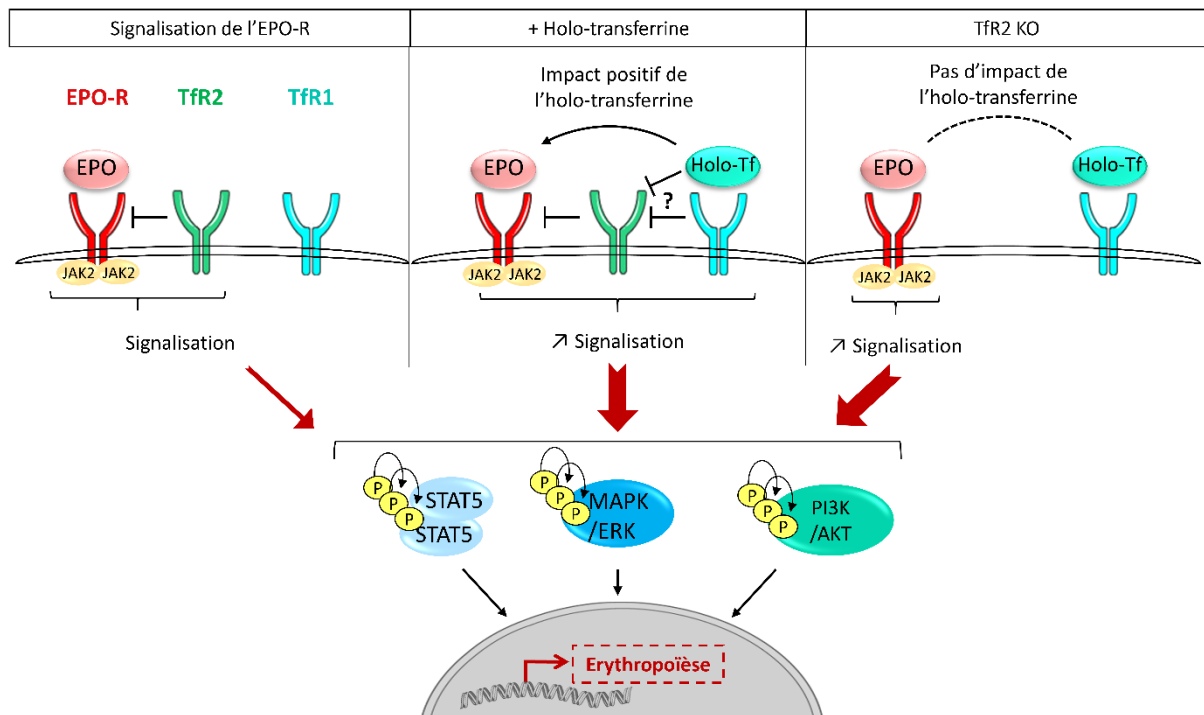


Figure 30. Représentation schématique de notre hypothèse sur le rôle de la transferrine et de ses récepteurs dans la régulation de l'érythropoïèse, à travers leur impact sur la signalisation du récepteur à l'EPO.

Perspectives

Puisque le TfR2 a un rôle dans l'érythropoïèse, il pourrait être intéressant de le cibler dans des pathologies associées à une altération de l'érythropoïèse. Si nous partons de l'hypothèse que le TfR2 est un régulateur négatif de la signalisation de l'EPO-R, alors une diminution de son expression ou de sa fonction pourrait permettre d'augmenter l'érythropoïèse – et pourrait donc corriger une anémie.

Cette stratégie a été explorée par Nai *et al.* dans un modèle murin : ils ont croisé sur modèle de souris déficientes en TfR2 dans la moelle (Nai *et al.* 2015) avec un modèle murin de bêta-thalassémie intermédiaire (Hbb^{th3/+}). Les auteurs avaient déjà montré que les cellules érythroïdes déficientes en TfR2 étaient plus sensibles à la stimulation par l'érythropoïétine (Nai *et al.* 2015). Dans ce modèle de thalassémie, les souris présentaient une amélioration de leur érythropoïèse et de la morphologie de leurs globules rouges, entraînant une correction partielle de leur anémie ainsi que de leur surcharge en fer (Artuso *et al.* 2018). Ceci résultait d'une activation des voies de signalisation induites par l'EPO.

Si l'on envisage une application clinique, il est cependant difficile de ne cibler le TfR2 qu'au niveau de la moelle osseuse. Or, les souris KO pour le TfR2 au niveau de l'organisme présentent une hémochromatose (Fleming *et al.* 2002, Kawabata *et al.* 2005, Nemeth *et al.* 2005, Wallace *et al.* 2005, Wallace *et al.* 2007), alors que les souris hétérozygotes TfR2^{+/-} ont un phénotype très modéré (Wallace *et al.* 2005).

Les auteurs ont donc également étudié un modèle dans lequel le TfR2 est délété de façon germinale mais hétérozygote. Cette délétion partielle du TfR2 dans tout l'organisme a eu un effet similaire d'amélioration de l'érythropoïèse dans leur modèle de thalassémie intermédiaire (Artuso *et al.* 2018).

Ainsi, le TfR2 pourrait être une cible intéressante dans le traitement de l'anémie. De plus, l'amélioration des réponses à l'EPO par ciblage du TfR2 n'est efficace qu'au niveau des cellules exprimant à la fois le TfR2 et l'EPO-R, ce qui peut avoir un intérêt pour limiter les effets « off-target » d'une telle stratégie thérapeutique.

Rôle du *Curcuma comosa*

Contexte

Il a été démontré que les œstrogènes pouvaient améliorer l'érythropoïèse (Kim et al. 2016), mais leur effet exact et leurs mécanismes d'action dans l'érythropoïèse restent imparfaitement connus.

Les phytoestrogènes sont des composés végétaux non stéroïdiens d'origine naturelle qui exercent une activité œstrogénique. *Curcuma comosa* Roxb (*Curcuma comosa*) est un phytoestrogène utilisé depuis longtemps en médecine traditionnelle thaïlandaise pour le traitement des symptômes de la ménopause (Piyachaturawat et al. 1995). ASPP 049 est le composant principal du *Curcuma comosa* (Suksamrarn et al. 2008) et présente une activité œstrogénique élevée (Winuthayanon et al. 2009).

Nous avons donc voulu explorer l'effet du *Curcuma comosa* et de son composé ASPP 049 sur la régulation de l'érythropoïèse, seuls ou en combinaison avec l'EPO ou le SCF.

Résumé des principaux résultats

Nos travaux ont permis de démontrer que l'ASPP 049, en combinaison avec une concentration sous-optimale (physiologique) d'EPO, améliore la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythroïdes humains et murins précoces (CD34+) mais non tardifs (CD36+). Ces effets semblent similaires à ceux observés avec les œstrogènes. Ces résultats sont intéressants car peu de facteurs ont démontré un effet sur l'érythropoïèse précoce, la plupart des régulateurs connus ayant plutôt un effet sur la différenciation terminale.

Nous avons pu montrer que cette action de l'ASPP 049 passait par le récepteur aux œstrogènes alpha (ER- α), et l'activation des trois principales voies de signalisation de l'érythropoïèse induites par l'EPO : STAT5, MAPK/ERK et PI3K/AKT (**Figure 31**).

In vivo, nous n'avons observé que très peu d'effet du *Curcuma comosa* sur l'érythropoïèse basale. Après irradiation, il semble cependant que le *Curcuma comosa* puisse permettre une sortie d'aplasie un peu plus précoce de la lignée érythropoïétique. Aucun effet n'a été observé sur les autres lignées. Ces données sont en cours de confirmation.

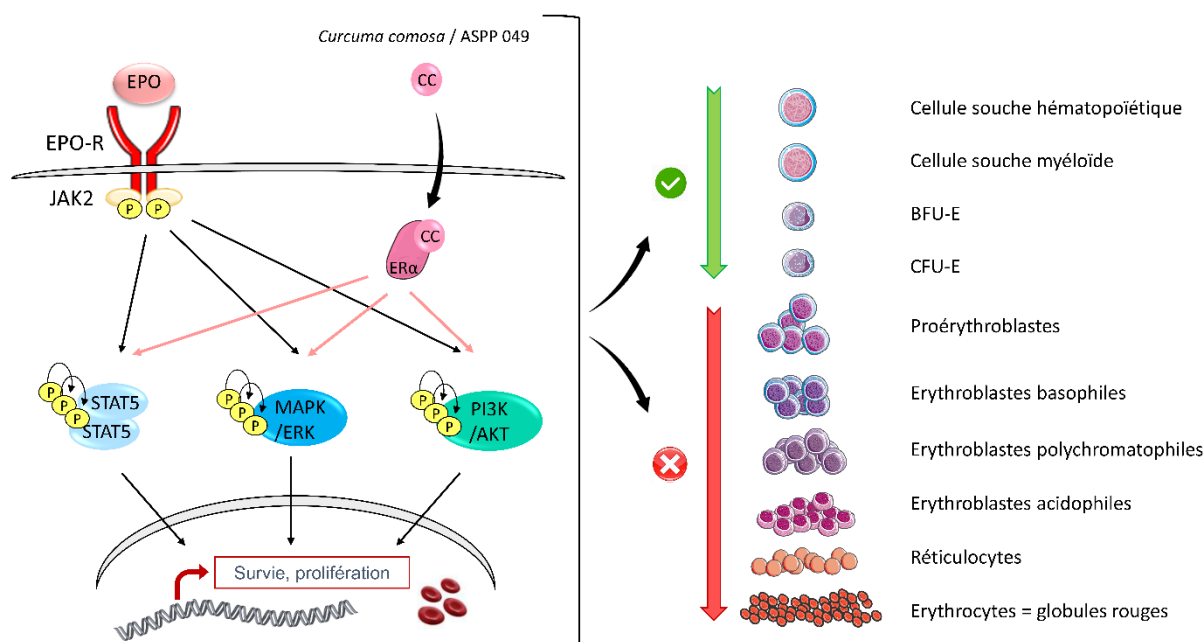


Figure 31. Représentation schématique de nos résultats sur le rôle du *Curcuma comosa* et de son composant l'ASPP 049 sur l'érythropoïèse.

Limites

Malgré des données *in vitro* encourageantes, le *Curcuma comosa* semble avoir un effet biologique faible, ce qui peut limiter la portée de nos résultats. Cependant, même si le bénéfice sur l'érythropoïèse paraît modéré, il peut être intéressant puisque le *Curcuma comosa* est un traitement facilement disponible et déjà largement utilisé chez l'homme.

Dans nos expériences *in vitro* et *in vivo*, nous avons observé une toxicité du *Curcuma comosa* et de son composé ASPP 049 lorsqu'ils étaient utilisés à forte dose. Cette forte dose correspondant au double de la dose efficace *in vivo*, il se peut que la fenêtre thérapeutique efficace et non toxique soit relativement étroite. Cette toxicité n'était pas observée avec les œstrogènes, aux doses que nous avons testées. Cependant, ce traitement est utilisé depuis longtemps en Thaïlande, parfois au long cours, sans que des effets indésirables notables aient été décrits.

De plus, nous nous sommes concentrés sur les effets directs du *Curcuma comosa* et de son composé ASPP 049 sur les cellules érythroïdes, mais il est possible que ces effets directs soient associés à des effets indirects, par exemple via une modulation de la synthèse d'EPO ou du métabolisme du fer. Sur le plan du mécanisme,

il est possible que la voie génomique des récepteurs aux œstrogènes soient également impliqués, en plus de la voie non génomique que nous avons étudiée.

Conclusion et perspectives

Nos données suggèrent que le *Curcuma comosa* pourrait avoir un effet bénéfique sur les progéniteurs érythroïdes précoces en coopération avec l'EPO, mais non sur les progéniteurs érythroïdes tardifs ni sur les cellules des autres lignées. *In vitro*, il favorise la prolifération et la différenciation des progéniteurs via une coopération entre la signalisation de l'ER- α et celle de l'EPO-R, et *in vivo*, il permet une récupération érythroïde légèrement plus rapide après irradiation.

Une application clinique possible serait donc d'utiliser le *Curcuma comosa* dans le traitement de l'anémie, et particulièrement le traitement des anémies d'origine centrales telles que les anémies post-chimiothérapie, qui impliquent les progéniteurs précoces. Le *Curcuma comosa* pourrait être utilisé en coopération avec l'EPO, afin d'augmenter son efficacité.

Une autre piste qui serait intéressante à explorer serait de savoir si le *Curcuma comosa* a également une action sur les cellules souches leucémiques. En effet, les cellules souches leucémiques exploitent de nombreux mécanismes similaires aux cellules souches normales pour leur auto-renouvellement (Heidel et al. 2011). La stimulation de ces cellules souches leucémiques, en augmentant leur mise en cycle, peut les rendre plus sensibles à la chimiothérapie et à certains traitements ciblés. Cette approche a déjà été testée en clinique, notamment avec le facteur de croissance G-CSF (Yamada et al. 1995, Estey 2001). Le *Curcuma comosa*, en stimulant les progéniteurs érythroïdes précoces via l'activation de la signalisation de l'ER- α , pourrait avoir un effet similaire – toutefois limité à la lignée érythroïde. Cependant, les résultats de plusieurs essais randomisés n'ont pas montré de bénéfice net, ne justifiant pas l'application de cette stratégie en routine. Nos résultats ayant été obtenus sur une lignée dérivée d'une érythroleucémie humaine, des études complémentaires sur le *Curcuma comosa* pourraient néanmoins être intéressantes dans des modèles plus complets d'érythroleucémie.

Enfin, l'interaction entre le *Curcuma comosa* et le métabolisme de la transferrine pourrait être intéressante à étudier, puisqu'il a été montré que l'expression du TfR1 était augmentée par le 17 β -œstradiol (E2) dans les cellules positives pour le récepteur aux œstrogènes (Dai et al. 2008). Une coopération entre ces deux systèmes pourrait donc exister, et la compréhension de cette coopération pourrait améliorer nos connaissances sur la régulation de l'érythropoïèse, ouvrant la voie à de nouvelles pistes thérapeutiques dans le traitement de l'anémie.

VIII. Conclusion

Dans ce travail, nous avons montré que la transferrine potentialise la stimulation induite par l'EPO de trois voies de signalisation majeures impliquées dans la survie et la prolifération des érythroblastes, indépendamment de l'endocytose du TfR1. Nous avons également observé qu'en l'absence du TfR2, il existe une augmentation de l'expression de l'EPO-R et de la signalisation induite par l'EPO, sans impact de la transferrine dans ce contexte.

Par ailleurs, nous avons montré que le *Curcuma comosa*, un phytoestrogène bien connu en Thaïlande, améliore la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythroïdes précoces, par un mécanisme de potentialisation de la signalisation induite par l'EPO impliquant l'ER- α .

En conclusion, la transferrine et ses récepteurs, ainsi qu'un phytoestrogène et le récepteur aux œstrogènes ER- α , sont impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse via leur action sur la signalisation induite par l'EPO. L'approfondissement de ces données pourrait ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques dans le traitement de l'anémie.

IX. Annexes

ANNEXE 1 – PROJET IGA POLYMERIQUES ET POLYGLOBULIE

Contexte du travail

Une polyglobulie correspond à une élévation de tous les paramètres de la lignée érythroïde. La polyglobulie primitive, appelée polyglobulie de Vaquez, est causée par une mutation somatique survenant dans des progéniteurs hématopoïétiques du gène de JAK2, une protéine impliquée dans la signalisation du récepteur à l'EPO. Cependant, d'autres causes de polyglobulies existent.

Ce travail porte sur la polyglobulie associée à la néphropathie à IgA. Il fait suite au travail réalisé précédemment dans le laboratoire, démontrant que les IgA polymériques sont des ligands du TfR1, et augmentent la sensibilité des progéniteurs érythroïdes à l'EPO (Coulon *et al.*, Nat Med 2011). Or, les patients atteints d'une néphropathie à IgA ont souvent une élévation des IgA polymériques, par rapport aux IgA monomériques.

Cet article mené par Camille Cohen a été soumis en tant que Brief Report au New England Journal of Medicine. Il a été reviewé, et j'ai participé aux expériences demandées dans le cadre de cette révision. Malheureusement, l'article révisé n'a pas été accepté et il est actuellement en cours de resoumission dans Journal of the American Society of Nephrology.

Principaux résultats

Dans cet article, les taux d'hémoglobine issus de grandes cohortes de patients souffrant d'insuffisance rénale chronique ont été analysés. Le taux d'hémoglobine était plus élevé chez les patients porteurs d'une néphropathie à IgA. La néphropathie à IgA était un facteur indépendant associé à des taux d'hémoglobine plus élevés en analyse multivariée. Les taux d'EPO étaient semblables entre les différentes étiologies d'insuffisance rénale chronique.

Dans un modèle murin de néphropathie à IgA surexprimant les IgA polymériques humaines, une augmentation de l'hématocrite était observée, sans différence de taux d'EPO.

De plus, les cas de 6 patients porteurs d'une néphropathie à IgA associée à une polyglobulie sont décrits. Ces patients avaient une élévation du taux d'IgA polymériques avec un ratio d'IgA polymériques/IgA monomériques élevé, et leur sérum augmentait la sensibilité à l'EPO de progéniteurs érythroïdes.

Ainsi, en cas de polyglobulie inexpliquée, une polyglobulie associée aux IgA pourrait être recherchée, en évaluant le ratio IgA polymériques/IgA monomériques.

A syndrome of IgA related polycythemia

Camille Cohen^{1,2,15}, Séverine Coulon^{3,4,15}, Kanit Bhukhai^{3,15,18}, Antoine Neuraz^{5,16}, Michael Dussiot^{3,16}, Guillemette Fouquet³, Martin Flamant^{6,7}, François Vrtovsni^{6,8}, Aurélie Hummel², Bertrand Knebelmann^{1,2}, Laurent Mesnard⁹, Eric Rondeau⁹, Thiago T. Maciel³, Fabrizia Favale¹⁰, Nicole Casadevall¹⁰, Thao Nguyen-Khoa¹¹, Stéphane Moutereau¹², Christophe Legendre^{1,2}, Renato C. Monteiro⁶, Marc Benhamou⁶, Olivier Hermine^{3,13,17}, Khalil El Karoui^{14,17}, Ivan C. Moura^{3,17}

Affiliations:

1 INSERM U1151 « mechanisms and therapeutic strategies of chronic kidney diseases », Hôpital Necker, Université Sorbonne Paris Cité, Paris, France

2 Service de Néphrologie et Transplantation rénale, APHP, Hôpital Necker, Paris, France

3 INSERM UMR1163, CNRS ERL8254 « Laboratory of physiopathology of blood disorders and their therapeutic implications », Laboratoire d'excellence GR-Ex, Université René-Descartes, Imagine Institute, Paris, France

4 Service de Pharmacie, Grand Hôpital de l'Est Francilien, Coulommiers, France

5 Département d'Informatique Biomédicale, AP-HP, Hôpital Necker, Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM UMR 1138 Equipe 22, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

6 INSERM UMR1149 ; CNRS ERL8252 ; Equipe labellisée LIGUE 2015 ; Université Denis-Diderot, Laboratoire d'excellence INFLAMEX ; Service d'Immunologie, DHU Fire, Hôpital Bichat-Claude Bernard, AP-HP ; Paris, France

7 Service de Physiologie, AP-HP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France

8 Service de Néphrologie, AP-HP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France

9 Urgences Néphrologiques et Transplantation Rénale, AP-HP, Hôpital Tenon, Paris, France

10 Service d'hématologie biologique, AP-HP, Hôpital Saint Antoine, Paris, France

11 Service de biochimie, AP-HP, Hôpital Necker, Paris, France

12 Service de biochimie, AP-HP, Hôpital Henri Mondor, Paris-Est Université Créteil, France

13 Service d'Hématologie clinique, AP-HP, hôpital Necker, Paris, France

14 Service de Néphrologie et Transplantation rénale, AP-HP, Hôpital Henri Mondor, Institut Mondor de recherche biomédicale (IMRB), Paris-Est Université Créteil, France

15 These authors contributed equally to this work

16 These authors contributed equally to this work

17 These authors share senior authorship

18 Present address: Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Running title: IgA related polycythemia

Key words: IgA, IgA nephropathy, polycythemia, Transferrin receptor

Textword count: 1984

Correspondence:

Dr. Ivan C. Moura, INSERM-UMR1163, Institut Imagine, 24 Bd du Montparnasse, 75015 Paris, France. Phone: 33-1-4275-4285; Fax: 33-1-4275-4217; Email: ivan.moura@inserm.fr

Pr Olivier Hermine, INSERM-UMR1163, Institut Imagine, 24 Bd du Montparnasse, 75015 Paris, France. Phone: 33-1-4275-4285; Fax: 33-1-4275-4217; Email: ohermine@gmail.com

Dr Khalil El Karoui Service de Néphrologie et Transplantation rénale, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France. Email: khalil.el-karoui@aphp.fr

SUMMARY

Polycythemia is a hematological disorder characterized by hemoglobin elevation usually related to germline or hematopoietic stem cell somatic mutations in genes involved in hypoxia regulation. However, causes of some polycythemia remain unidentified. Here, we describe 6 patients presenting polycythemia associated with IgA nephropathy (IgAN). Their circulating IgA had elevated polymeric/monomeric IgA1 ratios (pIgA1/mIgA1) and increased the Epo sensitivity of erythroid progenitors. In large chronic kidney disease cohorts, IgAN was an independent factor associated to higher hemoglobin levels. We propose that in case of unexplained polycythemia, syndrome of IgA-related polycythemia (SIGAP) should be investigated, by looking for IgAN and pIgA1/mIgA1 ratios.

Erythropoiesis is a tightly regulated process that adapts the production of mature erythrocytes to supply organs with oxygen. This process relies essentially on the level of circulating erythropoietin (Epo), which acts on erythroid progenitors/precursors to regulate their survival, proliferation and, to a lesser extent, differentiation^{1,2}.

Overproduction of erythrocytes can lead to polycythemia/erythrocytosis (PE)³. Somatic mutations occurring in hematopoietic progenitors (*e.g.* JAK2^{V617F}) and, rarely, other mutations that induce hypersensitivity to Epo, are the most frequent etiologies of PE. Other causes include inappropriate production of Epo linked to kidney tumor, hypoxia or abnormal response to hypoxia. However, in some cases no etiology can be identified⁴.

We previously reported that polymeric IgA1 (pIgA1) interact with transferrin receptor 1 (TfR1/CD71) and participate, in mice, to the regulation of erythropoiesis by increasing the sensitivity of erythroid progenitors/precursors to Epo^{5,6}. We hypothesized that pIgA1 could be involved in dysregulated erythropoiesis in human. Here, we describe a PE syndrome occurring in patients with IgA nephropathy (IgAN), a chronic kidney disease (CKD) related to immune complex deposits of under-galactosylated pIgA1 in kidney mesangium^{7,8}. We demonstrate that circulating IgA from these patients increase erythroid progenitor sensitivity to Epo, explaining the pathophysiology of this syndrome. Furthermore, in large cohorts of patients with various CKD etiologies, IgAN was an independent factor associated with higher steady-state Hb level and anemia recovery after kidney transplantation.

CASE REPORTS

Patient1

A 20-year-old man was referred for microscopic hematuria and hypertension. Serum creatinine was 50 μ mol/L, without proteinuria. He presented no past medical history. Kidney biopsy revealed mild proliferative mesangial glomerulonephritis, with mesangial IgA and C3 deposits. Hemoglobin (Hb) level was 16.3 g/dL, and hematocrit (HCT) was 48%. During follow-up, angiotensin receptor blocker (ARB) treatment was introduced to control new onset proteinuria (1g/day). At the age of 64, despite renal failure occurrence with a serum creatinine at 162 μ M (measured GFR (mGFR) of 37.8 mL/min/1.73m²) and a stable proteinuria of 0.7g/day, the patient developed PE (Hb 18.6g/dL, HCT 55.5%) with normal leukocyte and platelet counts and no splenomegaly.

Patient 2

A 63-year-old man with no past medical history was referred for microscopic hematuria, hypertension, proteinuria (4g/day), and a serum creatinine 230 μ mol/L (estimated (e)GFR of 25 mL/min/1.73m²). Kidney biopsy revealed mesangial glomerulonephritis with mesangial thickening but without proliferation or segmental lesions. Interstitial fibrosis was observed in approximately 20% of the biopsy. Immunofluorescence (IF) confirmed IgAN. Hb level was 12.9 g/dL and HCT 37.9%. Angiotensin conversion enzyme inhibitor (ACEi), ARB and thiazide treatments were introduced. At the age of 74, he developed PE with Hb17.8g/dL and HCT 54.6%. Leukocyte and platelet counts were normal. No splenomegaly was evidenced. Renal function was altered with mGFR 28mL/min/1.73m². After 12 years of follow-up, serum creatinine was 171 μ M and proteinuria 0.2g/day.

Patient 3

A 26-year-old man was referred for microscopic hematuria and proteinuria (2.3g/day), with normal renal function (serum creatinine 88 μ mol/L, eGFR 91ml/min/1.73m²). Kidney biopsy revealed mesangial glomerulonephritis without proliferation. IF confirmed IgAN. Hb was 15.1 g/dL and HCT 45%. ACEi (but no diuretic) treatment was started with significant reduction of proteinuria. At the age of 69, while renal function started to be altered with mGFR 59mL/min/1.73m², he developed PE (Hb18.5 g/dL, HCT55%). Leukocyte and platelet

counts were normal. After 44 years of follow-up, serum creatinine was 128 μ M and proteinuria 0.8g/day.

Description of 3 other patients is available in supplementary information.

MATERIALS and METHODS

Patients with IgAN and unexplained polycythemia according to biological WHO criteria³ (IgAN-PE) were identified by retrospective analysis of medical records from 2 tertiary nephrology centers (Necker, Tenon). Serum and DNA extracted from PBMC were obtained after written informed consent and local ethics committee approval. Control sera were from IgAN patients with normal HCT, and healthy volunteers. Circulating Epo and soluble TfR1 (sTfR1, Bio-Techne 2474-TR-050) were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoturbidimetric methods, respectively. eGFR was calculated according to CKD-Epi formula⁹.

Two multicentric prospective cohorts of CKD patients were studied, (i) the NephroTest study, that enrolled 1993 non-ESRD adult patients with iterative mGFR and written informed consent¹⁰, (ii) the DIVAT (*Données Informatisées et VALidées en Transplantation*) cohort, which includes renal transplant patients from 2005 to 2015¹¹. From the NephroTest study, patients with glomerulonephritis (GN) were selected to limit heterogeneity of the cohort that includes most patients with no histological diagnosis. We also excluded patients with autoimmune disease who receive immunosuppressive drugs known to potentially reduce Hb levels.

Human CD34⁺ cord blood cells were cultured on methylcellulose (Methocult SF H4236, Stemcell technologies, Vancouver, Canada) with interleukin-3 (IL-3), IL-6, SCF and Epo (0.05 or 1 U/mL) in the presence of sera from IgAN-PE or IgAN patients and healthy volunteers. Depletion of IgA1 was performed as described⁶. BFU-E–derived colonies were counted at day 14. Quantification of IgA in serum was performed using Architect c16000[®] analyzer (Abbott) with an immunoturbidimetric method. Immunoblotting for monomeric and polymeric IgA1 was performed as described¹². For binding assays, cells (0.25×10^6) were pre-incubated with 1 mg/mL human IgG for 30 min on ice to block IgG receptors. IgA binding was examined using an indirect immunofluorescence assay¹³. For inhibition studies, cells were pre-incubated with the recombinant sTfR1 (Bio-Techne 2474-TR-050) before analysis of IgA

binding by flow cytometry. Data were analyzed with FlowJo software (FlowJo LLC, Ashland, Oregon). Alpha1 knock-in transgenic mice were previously described⁶.

For *in vitro* experiments, statistical analyses were performed with GraphPad Prism Software version 5.0. Data are expressed as mean $\pm$ SEM of *n* determinations unless noted otherwise. Mann-Whitney test was used to compare two groups. Differences were considered significant at a P value <0.05 (*), <0.01 (**) or <0.001 (***).

For statistical analysis of clinical cohorts, we used the Kruskal-Wallis test for quantitative co-variables, the Pearson's chi-square test for qualitative co-variables. We performed a multivariate linear regression with a bidirectional stepwise selection of covariates. The initial model included all the covariates associated with Hb level ($P < 0.05$) in a bivariate analysis. Analyses were performed using R Statistical software version 3.3.2. The local ethics committee approved this study.

RESULTS

IgAN patients frequently have increased polymeric/monomeric IgA1 (pIgA1/mIgA1) ratio¹⁴, and human pIgA1 induce Epo hypersensitivity of erythroid progenitors through activation of TfR1 in human IgA1 knock-in (α 1KI) mouse model⁶. We thus hypothesized that pIgA1 from IgAN patients could stimulate erythropoiesis in humans and favor PE.

First, we compared PE prevalence and Hb levels in large cohorts of CKD patients. In the Nephrotest study¹⁰, we delineated 4 patient groups based on CKD etiology that included IgAN, other glomerulonephritis (GN), polycystic kidney disease (PKD), and diabetes (DN) (Table S1). There was a higher prevalence of PE in IgAN patients according to WHO criteria³, since 6 out of 171 IgAN patients (3.5%) presented with PE compared with 2/117 PKD, 0/179 other GN and 0/229 DN patients ($p=0.004$). Overall, Hb level was higher in IgAN patients than in patients with PKD, diabetes and other GN ($p < 0.0001$). The multivariate analysis including age, sex, mGFR, Epo or iron supplementation as covariates showed that IgAN is an independent factor associated with higher Hb levels ($p=0.01$) (Table S2 and Fig. 1A). Circulating Epo levels were similar in IgAN-PE, IgAN and other CKD patients (Supplemental Figure S1). To study the role of pIgA1 *in vivo*, we used a mouse model of IgAN which overexpress human pIgA1, the α 1KI mice⁶. Similarly to patients, we observed an elevation of hematocrit in these mice, with no difference in Epo levels (Supplemental Figure S2-3). Collectively, these data support a role for IgA1 in erythropoiesis *in vivo* in mice and humans.

We then compared the Hb recovery status of IgAN *versus* other CKD patients following kidney transplantation since anemia occurs in the early post-renal transplant period¹⁵ and pIgA accelerate recovery from anemia in mice⁶. In the DIVAT post-transplant cohort Hb levels at 3 different time points (Month (M) 0, day of renal transplantation, M3 and M12 post-transplantation) were available for 2600 patients including 271 IgAN (10.4%), 447 PKD (17.2%) and 248 DN (9.5%) patients. At M0, only male gender and PKD were associated with Hb level by multivariate analysis. The mean change of Hb level at M3 and M12 compared to M0 was higher in IgAN compared to DN and other groups (Δ Hb M3-M0= 0.87, -0.06 and 0.22g/dL respectively; Δ Hb M12-M0= 1.36, 0.55 and 0.71g/dL, respectively) (Fig. 1B). Moreover, twelve months after transplantation, IgAN patients presented higher Hb level compared with other patients (13.1 vs 12.7g/dL, $p=0.001$; Table S2). Taken together, these

data demonstrate that in IgAN patients, Hb recovery and level after transplantation are faster and greater, respectively.

Given these epidemiological data, we explored whether PE observed in the 6 IgAN patients could involve pIgA1. These patients (Table 1) developed a late-onset PE during follow-up, while paradoxically their mGFR decreased. Physical examinations did not show any evidence for myeloproliferative disease (e.g. no splenomegaly) or cerebellum hemangioblastoma. Renal and hepatic ultrasounds were normal. All patients had normal levels of Hb oxygen saturation and Epo and did not bear JAK2 mutation. After a median follow-up of 25.8 years (12.2-44.9), no patient developed myeloproliferative disorders or thrombotic complications. Thus, we further explored at the cellular level the involvement of pIgA1. CD34⁺ cord blood cells were plated with serum from IgAN-PE patients, or control individuals, in semisolid medium with a cytokine cocktail allowing erythroid progenitor proliferation, survival and differentiation. At suboptimal Epo concentration (0.05 U/mL), the number of erythroid burst forming unit (BFU-E)-derived colonies was increased in the presence of IgAN-PE *versus* control or IgAN serum (Fig. 2A). Removal of IgA1 from IgAN-PE serum decreased BFU-E-derived colony number to that observed with serum from healthy volunteers, while adding back the corresponding IgA1 to depleted IgAN-PE serum restored this number to its initial values (Fig. 2A). We then sought to understand the peculiarities of IgA from IgAN-PE patients that could explain these phenomenon. Serum IgA concentration showed no significant difference between IgAN-PE, IgAN and controls despite a trend towards a higher concentration for IgAN and IgAN-PE in this limited cohort (Fig. 2B). Immunoblot analysis of whole serum for total IgA (IgA1 and IgA2) did not show a higher pIgA/mIgA ratio (Fig.2C). However, when serum IgA1 was first jacalin-purified before immunoblot analysis, we observed an increased pIgA1/mIgA1 ratio in IgAN-PE serum (Fig. 2D).

In line with previous data in mice⁶, these results demonstrate that pIgA1 from IgAN-PE patients mediate Epo hypersensitivity of erythroid progenitor cells.

DISCUSSION

Here we describe a new etiology of human polycythemia in a subpopulation of IgAN patients related to an IgA-dependent Epo hypersensitivity of erythroid progenitors, which we propose to call SIGAP, for **S**ndrome of **I**gA-dependent **P**olycythemia. This syndrome appears among IgAN patients with the highest plgA1/mlgA1 ratio.

This new pathophysiological mechanism of polycythemia is probably not restricted to IgAN patients, since elevated plgA1/mlgA1 ratio has been also described during chronic liver disease or IgA myeloma¹⁶. Moreover, in familial forms of IgAN, increased plgA1/mlgA1 ratios have been observed in both patients and unaffected relatives¹⁷. Therefore, this etiology should be considered in sporadic and unexplained familial forms of polycythemia⁴.

Interestingly, Epo levels in SIGAP patients were similar to other CKD patients and within normal range, as previously observed in some PE patients with JAK2 mutation and “normal” Epo level¹⁸. Regulation of erythropoiesis in CKD is poorly understood. Actually, Epo levels are not correlated with Hb in non-anemic CKD patients, and may be regulated by other factors frequent in CKD, such as iron deficiency, obesity or inflammation¹⁹.

Most IgAN patients are currently treated with ACEi or ARB²⁰. Interestingly, renin-angiotensin system (RAS) activation has a positive effect on erythropoiesis and RAS inhibition may control Epo-dependent polycythemia²¹. We hypothesize that in some cases plgA1-dependent erythropoiesis stimulation might be attenuated by RAS inhibition.

Finally, this work confirms our previous report showing that plgA1 is a regulator of erythropoiesis. We may speculate that during evolution, the human IgA system has been selected in part to protect erythropoiesis in pathological conditions. In support of our hypothesis, IgAN patients presented higher Hb levels and better Hb recovery after transplantation than patients with other CKD etiologies. Although plgA1 amplified signal transduction pathways (e.g MAP kinases and PI3K/AKT) induced by Epo, further *in vitro* studies are still necessary to fully decipher molecular mechanisms involved in plgA1 promotion of Epo hypersensitivity. In conclusion, in case of unexplained polycythemia, increased plgA1/mlgA1 ratios and IgAN should be investigated as a possible cause.

Table 1: Clinical, demographical and biological data from the six patients with IgAN-PE.

Normal measurements: Epo: 1.4<N<13.7 mIU/L; sTfR: 1.9<N<4.4 mg/L. Abbreviations: IgAN: IgA nephropathy; GFR: glomerular filtration rate; Epo: erythropoietin, ACEi: angiotensin conversion enzyme inhibitor; ARB: angiotensin receptor blocker.

Patient #	age at polycythemia diagnosis	maximum hematocrit (%)	maximum hemoglobin (g/dL)	measured eGFR (mL/min/1.73m ²)	proteinuria (g/24h)	EPO level (mIU/L)	pulsed oxygen saturation (%)	Ferritin (µg/L)	transferrin saturation coefficient (%)	sTfR (mg/L)	ACEi or ARB
1	64	55.5	18.6	43	0.7	9.9	98	102	23	3.8	ARB
2	74	54.6	17.8	28	0.2	8.4	96	61	22	3.23	ACEi and ARB
3	69	55.0	18.5	59	0.7	8.4	96	181	25	6.53	ACEi
4	45	54.3	18	83	0.4	5.8	97	236	23	3.77	ARB
5	61	56.4	18.4	53	0.2	6.8	98	201	22	2.2	ARB
6	26	59	18.5	27	1.1	6.8	97	153	24	4.42	ARB

Legends to figure:

Figure 1: CKD cohort analysis.

A) Box plot of Hb level in Nephrotest cohort. Abbreviations: IgAN: IgA nephropathy; PKD: polycystic kidney disease; DN: diabetic nephropathy; GN: glomerulonephritis. *** $p<0.001$ for the comparison of Hb level between IgAN patients and other GN patients B) Mean change in Hb from M0, to M3 and M12 after renal transplantation in DIVAT cohort. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; Quantifications are shown for IgAN compared to other GN patients, for Hb between M3 and M0, and M12 and M0

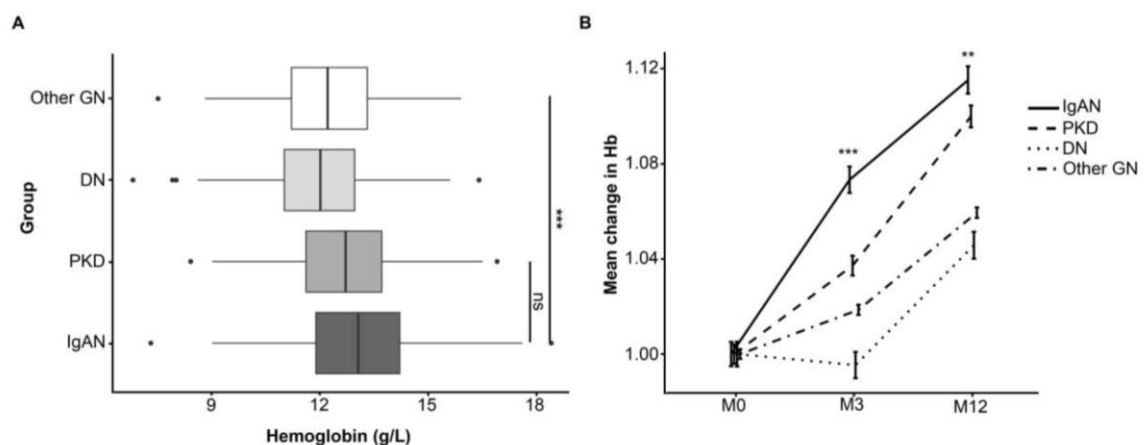
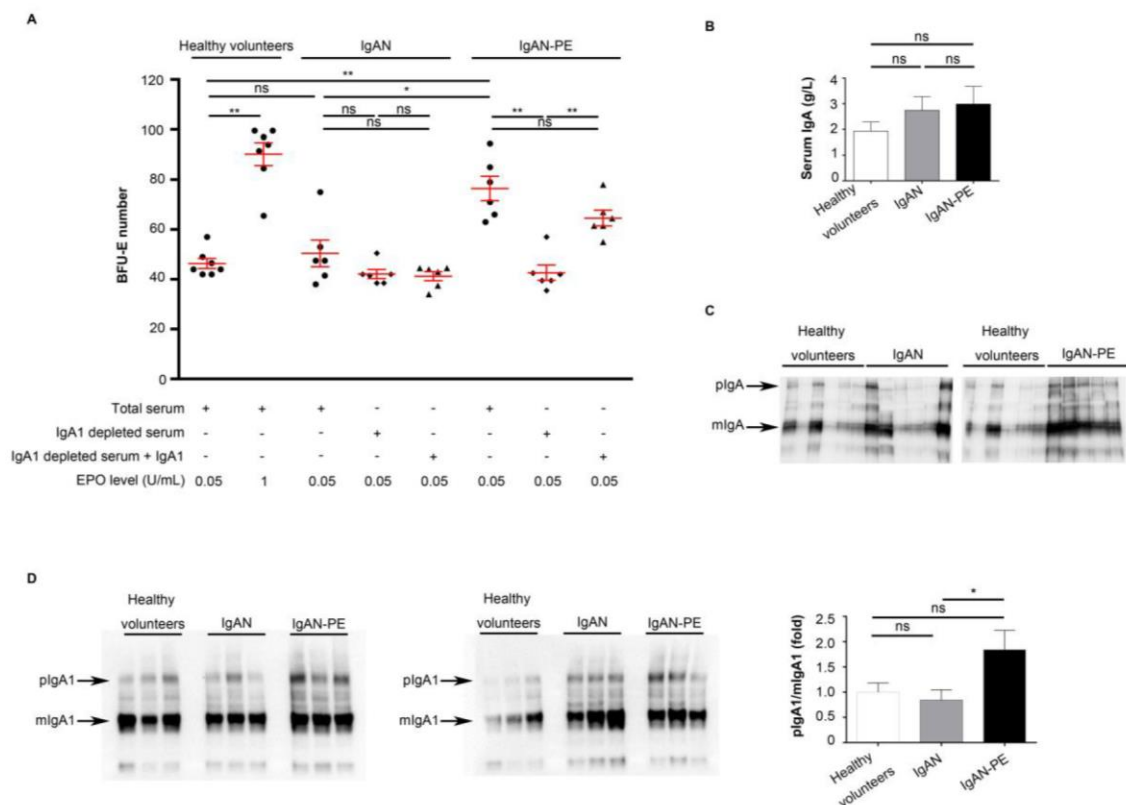


Figure 2: *In vitro* analysis of IgAN-PE serum

A) BFU-E-derived colonies from human CD34⁺ cord blood progenitors. The methylcellulose assay was performed with IL-3, IL-6, SCF and suboptimal or saturating concentrations of Epo (0.05 and 1 U/mL) in the presence of sera from healthy volunteers, IgAN or IgAN-PE patients. IgA1 depletion was performed by a jacalin purification protocol (black diamonds). Purified IgA1 were added back at the concentration of 0.2 mg ml⁻¹ (0.6 μM) (black triangles). All data are mean ± SEM, * p<0.05; ** p<0.01. (B) Quantification of IgA in serum. (C) The presence of IgA in serum was analyzed by immunoblotting with mouse monoclonal anti-human IgA1/IgA2 (BD Pharmingen) followed by anti-mouse secondary antibody coupled to horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich). (D) The ratio of polymeric to monomeric IgA1 (1 μL loaded in SDS-PAGE gels) was evaluated by immunoblotting of purified IgA1 with anti-IgA heavy chain antibody under non-reducing conditions. Individual samples (n=6 per condition) were loaded in two independent gels (* p<0.05).



REFERENCES

1. Weiss, G. & Goodnough, L. T. Anemia of chronic disease. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1011–1023 (2005).
2. Camaschella, C. Iron-deficiency anemia. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1832–1843 (2015).
3. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
4. Camps, C. *et al.* Gene panel sequencing improves the diagnostic work-up of patients with idiopathic erythrocytosis and identifies new mutations. *Haematologica* **101**, 1306–1318 (2016).
5. 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. JASN* **15**, 622–634 (2004).
6. Coulon, S. *et al.* Polymeric IgA1 controls erythroblast proliferation and accelerates erythropoiesis recovery in anemia. *Nat. Med.* **17**, 1456–1465 (2011).
7. Lai, K. N. *et al.* IgA nephropathy. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2**, 16001 (2016).
8. Robert, T., Berthelot, L., Cambier, A., Rondeau, E. & Monteiro, R. C. Molecular Insights into the Pathogenesis of IgA Nephropathy. *Trends Mol. Med.* **21**, 762–775 (2015).
9. Levey, A. S. *et al.* A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann. Intern. Med.* **150**, 604–612 (2009).
10. Moranne, O. *et al.* Timing of onset of CKD-related metabolic complications. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **20**, 164–171 (2009).
11. Chapal, M. *et al.* A useful scoring system for the prediction and management of delayed graft function following kidney transplantation from cadaveric donors. *Kidney Int.* **86**, 1130–1139 (2014).
12. Oruc, Z. *et al.* IgA Structure Variations Associate with Immune Stimulations and IgA Mesangial Deposition. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* (2016). doi:10.1681/ASN.2015080911
13. Berthelot, L. *et al.* Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors. *J. Exp. Med.* **209**, 793–806 (2012).
14. Valentijn, R. M. *et al.* Circulating and mesangial secretory component-binding IgA-1 in primary IgA nephropathy. *Kidney Int.* **26**, 760–766 (1984).
15. Martinez, F. *et al.* High dose epoetin beta in the first weeks following renal transplantation and delayed graft function: Results of the Neo-PDGF Study. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **10**, 1695–1700 (2010).
16. Woof, J. M. & Kerr, M. A. The function of immunoglobulin A in immunity. *J. Pathol.* **208**, 270–282 (2006).
17. Schena, F. P. *et al.* Abnormalities of the IgA immune system in members of unrelated pedigrees from patients with IgA nephropathy. *Clin. Exp. Immunol.* **92**, 139–144 (1993).
18. Ancochea, À. *et al.* The role of serum erythropoietin level and jak2 v617f allele burden in the diagnosis of polycythaemia vera. *Br. J. Haematol.* **167**, 411–417 (2014).
19. Mercadal, L. *et al.* Timing and Determinants of Erythropoietin Deficiency in Chronic Kidney Disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **7**, 35–42 (2012).

20. Berthoux, F. *et al.* Predicting the risk for dialysis or death in IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **22**, 752–761 (2011).
21. Vlahakos, D. V., Marathias, K. P. & Madias, N. E. The role of the renin-angiotensin system in the regulation of erythropoiesis. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **56**, 558–565 (2010).

Contexte du travail

La sérotonine est principalement connue pour son rôle de neurotransmetteur dans le système nerveux central, pourtant seulement une minorité de la sérotonine de l'organisme se trouve dans le cerveau.

La génération de souris KO pour la tryptophane hydroxylase 1 (Tph1, l'enzyme indispensable à la synthèse de sérotonine), qui sont déficientes en sérotonine périphérique avec un taux normal de sérotonine dans le système nerveux central, a permis d'identifier de nombreuses fonctions insoupçonnées de la sérotonine périphérique.

Dans ce travail, mené par Francine Côté au sein du laboratoire, il est démontré que la sérotonine a un rôle dans l'érythropoïèse. J'ai eu la chance de pouvoir participer à ce travail sur la partie relecture, réflexion et organisation des figures, ainsi qu'au moment des révisions. Nous avons depuis un travail en cours sur le rôle de la sérotonine dans les autres lignées hématopoïétiques.

Principaux résultats

Les auteurs ont démontré l'existence d'un système sérotoninergique complet fonctionnel au sein de la moelle osseuse. Ce système, présent chez l'homme et la souris, favorise la survie et la prolifération des progéniteurs érythroïdes.

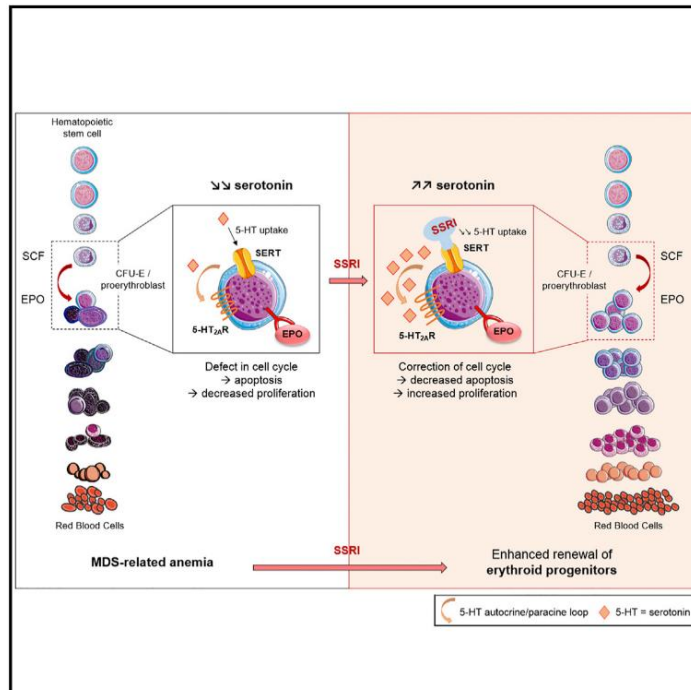
L'action locale autonome de la sérotonine contribue *in vivo* à une érythropoïèse normale, en coopération avec l'EPO – le gène de la Tph1 étant sous le contrôle de l'EPO. Dans des modèles d'anémie, l'augmentation du taux de sérotonine par l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine, qui sont des antidépresseurs d'usage courant, permet de restaurer le taux d'hémoglobine.

Les souris Tph1 KO développent avec l'âge une anémie avec un phénotype similaire à celui des syndromes myélodysplasiques (SMD). Les SMD sont des hémopathies préleucémiques caractérisées par des anomalies qualitatives (dysplasie) et quantitatives (cytopénies) des cellules des différentes lignées hématopoïétiques. On distingue les SMD de haut risque, dans lesquels le principal risque est la transformation en leucémie aiguë, et les SMD de bas risque, dans lesquels le principal problème est une anémie qui ne répond souvent que partiellement ou temporairement à l'EPO.

Or, les patients atteints de SMD de bas risque présentent également un déséquilibre du métabolisme de la sérotonine. L'utilisation d'antidépresseurs courants pourrait donc devenir une stratégie thérapeutique importante dans l'anémie des SMD de bas risque réfractaires à l'EPO.

Enhanced Renewal of Erythroid Progenitors in Myelodysplastic Anemia by Peripheral Serotonin

Graphical Abstract



Authors

David Sibon, Tereza Coman, Julien Rossignol, ..., Michaela Fontenay, Olivier Hermine, Francine Côté

Correspondence

francine.cote@parisdescartes.fr

In Brief

Sibon et al. identify a cell-autonomous serotonergic network in human and mouse erythroid progenitors. Reduced levels of serotonin lead to decreased proliferation and survival of erythroid progenitors. Increasing serotonin's concentration through fluoxetine, commonly used to treat depression, could be a valuable therapeutic intervention to correct myelodysplastic-syndrome-related anemia.

Highlights

- In mouse, bone-marrow-derived serotonin (5-HT) contributes to normal erythropoiesis
- Serotonin-deficient mice exhibit anemia and an MDS-like phenotype
- Lack of 5-HT decreases proliferation and survival of human erythroid progenitors
- Pharmacologic restoration of 5-HT can rescue anemia, whether MDS related or not



Sibon et al., 2019, Cell Reports 26, 3246–3256
March 19, 2019 © 2019 The Authors.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.071>

CellPress

Enhanced Renewal of Erythroid Progenitors in Myelodysplastic Anemia by Peripheral Serotonin

David Sibon,^{1,11} Tereza Coman,^{1,10,11} Julien Rossignol,^{1,10,11} Mathilde Lamarque,¹ Olivier Kosmider,² Elisa Bayard,¹ Guillemette Fouquet,¹ Rachel Rignault,¹ Selin Topçu,¹ Pierre Bonneau,¹ Florence Bernex,^{3,4} Michael Dussiot,¹ Kathy Derooy,⁵ Laetitia Laurent,⁵ Jacques Callebort,⁶ Jean-Marie Launay,⁶ Sophie Georgin-Lavialle,⁷ Geneviève Courtois,¹ Luc Maroteaux,⁸ Cathy Vaillancourt,⁵ Michaela Fontenay,² Olivier Hermine,^{1,9,12} and Francine Côté^{1,12,13,*}

¹Institut Imagine, INSERM U1163, CNRS ERL 8254, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris-Cité, Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Paris, France

²Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR 8104, Université Paris Descartes, Paris, APHP, Service d'Hématologie Biologique, Hôpitaux Universitaires Paris Centre-Cochin, Paris 75014, France

³Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier 34298, France

⁴INSERM, U1194, Network of Experimental Histology, BioCampus, CNRS, UMS3426, Montpellier 34094, France

⁵INRS-Institut Armand-Frappier and Center for Interdisciplinary Research on Well-Being, Health, Society and Environment, Montreal, QC H7V 1B7, Canada

⁶Service de Biochimie, INSERM U942, Hôpital Lariboisière, 75010 Paris, France

⁷Département de Médecine Interne, Hôpital Tenon, Université Pierre et Marie Curie, AP-HP, 4 rue de la Chine, 75020 Paris, France

⁸INSERM UMR-S1270, Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, Institut du Fer à Moulin, 75005 Paris, France

⁹Department of Hematology, Hôpital Necker AP-HP, 75015 Paris, France

¹⁰Département d'Hématologie, Gustave Roussy Cancer Campus Grand Paris, 94800 Villejuif, France

¹¹These authors contributed equally

¹²Senior author

¹³Lead Contact

*Correspondence: francine.cote@parisdescartes.fr

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.071>

SUMMARY

Tryptophan as the precursor of several active compounds, including kynurenine and serotonin, is critical for numerous important metabolic functions. Enhanced tryptophan metabolism toward the kynurenine pathway has been associated with myelodysplastic syndromes (MDSs), which are preleukemic clonal diseases characterized by dysplastic bone marrow and cytopenias. Here, we reveal a fundamental role for tryptophan metabolized along the serotonin pathway in normal erythropoiesis and in the physiopathology of MDS-related anemia. We identify, both in human and murine erythroid progenitors, a functional cell-autonomous serotonergic network with pro-survival and proliferative functions. *In vivo* studies demonstrate that pharmacological increase of serotonin levels using fluoxetine, a common antidepressant, has the potential to become an important therapeutic strategy in low-risk MDS anemia refractory to erythropoietin.

INTRODUCTION

Myelodysplastic syndromes (MDSs) are a heterogeneous group of myeloid malignancies highly prevalent among older individuals. Bone marrow cellular morphology showing dysplasia of any of the three hematopoietic lineages and the percentage of blasts leads to the diagnosis and classification of MDSs (Mufti

et al., 2008; Arber et al., 2016). For instance, low-risk MDSs, which include refractory anemia with ringed sideroblasts (RARS), have been associated with impaired erythroid-proliferating capacities of multifactorial causes, including molecular abnormalities as well as microenvironmental factors (Malcovati and Cazzola, 2016). Despite the fact that erythropoietin (EPO) has demonstrated some clinical benefit, many patients, especially those with RARS, are EPO refractory, thereby remaining transfusion dependent and at higher risk for transfusion-related comorbidities (Malcovati et al., 2005; Cazzola and Malcovati, 2005). Hence, identifying mechanisms of anemia and drugs to improve ineffective erythropoiesis at initial stages of MDS will contribute to increase the quality of life of patients, reduce comorbidities, and eventually increase overall survival.

Tryptophan is an essential amino acid that can be metabolized to several active compounds, including kynurenine, kynurenic acid, and quinolinic acid. The synthesis of these metabolites is regulated by an enzymatic cascade, known as the kynurenine pathway. Key enzymes of the pathway are indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) (Chen and Guillemin, 2009). IDO is ubiquitously expressed and present in most extrahepatic tissues, and TDO present in the liver is responsible for regulating systemic tryptophan levels. Tryptophan is also the precursor of serotonin (5-hydroxytryptamine or 5-HT), a monoamine highly conserved throughout evolution. 5-HT synthesis is initiated by the rate-limiting enzyme, tryptophan hydroxylase (Tph), with two isoforms: Tph1 in the periphery and Tph2 in the central nervous system (CNS) (Walther et al., 2003; Côté et al., 2003). 5-HT synthesized by Tph2 has a well-recognized role as neurotransmitter, acting on 5-HT receptors in various brain regions. 5-HT receptors have also been shown



to exist in several nonneuronal tissues (Hannon and Hoyer 2008). To explore *in vivo* the functions involving extra-cerebral 5-HT, we and others generated a Tph1 knockout mouse model (Tph1^{-/-}) and revealed unexpected roles for the monoamine in normal and pathological conditions (reviewed in Amireault et al., 2013 and Spohn and Mawe, 2017).

A tight control of tryptophan metabolism is critical for maintaining healthy homeostasis, as changes in tryptophan concentrations have been associated with physiological and behavioral processes (Platten et al., 2012; Oxenkrug, 2010). Interestingly, MDSs were reported to be associated with greater tryptophan breakdown and higher kynurenine levels, implying that enhanced tryptophan metabolism and elevated levels of kynurenine metabolites in the patients' sera could inhibit hematopoietic progenitor amplification (Berthon et al., 2013).

Yet, a fundamental issue has not been carefully investigated in MDS patients. Due to enhanced tryptophan metabolism, the amino acid may no longer be available for 5-HT production? Hence, the lack of 5-HT itself may lead to the emergence of myelodysplastic-related anemia?

The pharmacological and genetic evidences presented here demonstrate that tryptophan metabolism along the kynurenine pathway and the accumulation of tryptophan metabolites do not appear as a primary event in the development of low-risk MDS. Our results reveal that a functional autocrine serotonergic network exists in both murine and human erythroid lineages and that lack of 5-HT participates to the physiopathology of MDS-related anemia. We identified Tph1 as an erythroid gene and uncovered a fundamental role for 5-HT in regulating hematopoietic stem cell fate along the erythroid pathway. EPO induces *TPH1* expression and 5-HT synthesis necessary for erythroid progenitor's survival and proliferation. Importantly, as one of the hallmarks of MDS is ineffective hematopoiesis with anemia, our findings argue that the use of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), such as fluoxetine—a common antidepressant, in the earliest stages of MDS, where anemia is a major sign, may represent an innovative therapeutic strategy.

RESULTS

Patients with Low-Risk Myelodysplastic Syndrome Exhibit an IDO/Tph1 Enzyme Activity Imbalance

Altered gene expression, associated with a disease in a cohort of patients, may be revealed by the identification of upregulated or downregulated genes. To further investigate a potential role for the kynurenine pathway in MDSs, we performed gene expression analysis of enzymes involved in tryptophan metabolism. Compared to the healthy control population ($n = 5$), in MDS patients ($n = 27$), we observed a deregulated expression between *TPH1* and *IDO*, and the expression of *TDO* was similar (Figure 1A). As previously proposed, these findings support the hypothesis that deregulation of tryptophan metabolism, involving an increase in *IDO* activity, may be a rate-limiting step leading to the emergence of MDSs (Berthon et al., 2013). Yet, in our cohort, a puzzling result is the decrease in *IDO* gene expression in MDS patients as compared to control individuals (Figure 1A). We hypothesized that the % of *IDO*

activity in MDS patients (as measured by the Kyn/Trp ratio) could result in diversion of some of the available tryptophan toward the kynurenine pathway and deprived cells of 5-HT. Along that line, when taking the Kyn/Trp ratio as a measure of tryptophan metabolism, we next performed analysis of *IDO* in a separate cohort of MDS patients ($n = 71$). Figure 1B provides evidence of an inverse correlation ($r^2 = 0.2943$; $p < 0.0001$) between the Kyn/Trp ratio and tryptophan plasma levels, indicating that an increase in *IDO* activity leads to greater tryptophan metabolism. In that cohort of MDS patients, *IDO* activity was inversely correlated with hemoglobin (Hb) levels ($r^2 = 0.2376$; $p < 0.0110$; Figure 1C). Considering all MDS patients of the cohort, no correlation was observed between Hb values and tryptophan levels ($r^2 = 0.045$; $p < 0.0732$; Figure 1D). But in patients with low MDS severity scores ($n = 19$; assigned in accordance with the International Prognosis Scoring System [IPSS]; Greenberg et al., 1997), a significant correlation ($r^2 = 0.3406$; $p < 0.0049$) between plasma tryptophan and whole-blood Hb levels was observed (Figure 1E). Likewise, analysis of those patients with the highest levels of *TPH1* gene expression ($n = 11$ in red in Figure 1A) revealed lower IPSS scores and a trend toward a positive correlation between *TPH1* expression and Hb levels (Figure 1F). These findings suggest that enhanced *IDO* activity may have resulted in diversion of the available tryptophan, depriving cells of 5-HT, leading to the emergence of MDS. Indeed, measurement of 5-HT levels from freshly drawn blood demonstrated a significant decrease in MDS patients ($n = 15$) as compared to control individuals ($n = 14$; Figure 1G). At last, a positive correlation between 5-HT and Hb levels was observed in low-risk MDS patients ($r^2 = 0.4119$; $p < 0.0454$; Figure 1H).

Together, the results indicate that disruption of tryptophan metabolism between the Tph1 and *IDO* pathways and diversion of the available tryptophan away from 5-HT synthesis can be an important event prior to the development of myelodysplastic anemia.

Identification of a Serotonergic System in Human Erythroid Progenitors to Increase Their Survival and Proliferation

Although it is well established that *TPH1*, the rate-limiting enzyme for peripheral 5-HT synthesis, is mainly expressed in gut enterochromaffin cells, a growing body of evidence has led to the discovery of complete serotonergic systems, including the specific membrane serotonin transporter (SERT) and the full repertoire of serotonergic receptors, in unexpected locations (reviewed in Amireault et al., 2013 and Spohn and Mawe, 2017; Hannon and Hoyer, 2008), albeit little is known regarding components of the 5-HT system in hematopoietic cells. The previous results, indicating that MDS-related anemia could be explained by reduced 5-HT levels, prompted us to explore whether components of the system were present in hematopoietic cells of the erythroid lineage. In purified human CD36⁺ cord blood cells, using qRT-PCR, we demonstrate that mRNA for *TPH1*, the 5-HT_{2A} receptor (*5-HT_{2A}R-HTR2a*), and the 5-HT-specific membrane transporter (*SERT-slc6a4*) were highly expressed at the specific pro-erythroblast stage of differentiation (day 3 of the culture after CD36⁺ isolation; Zermati et al., 2000, 2001; Figures 2A–2C). At

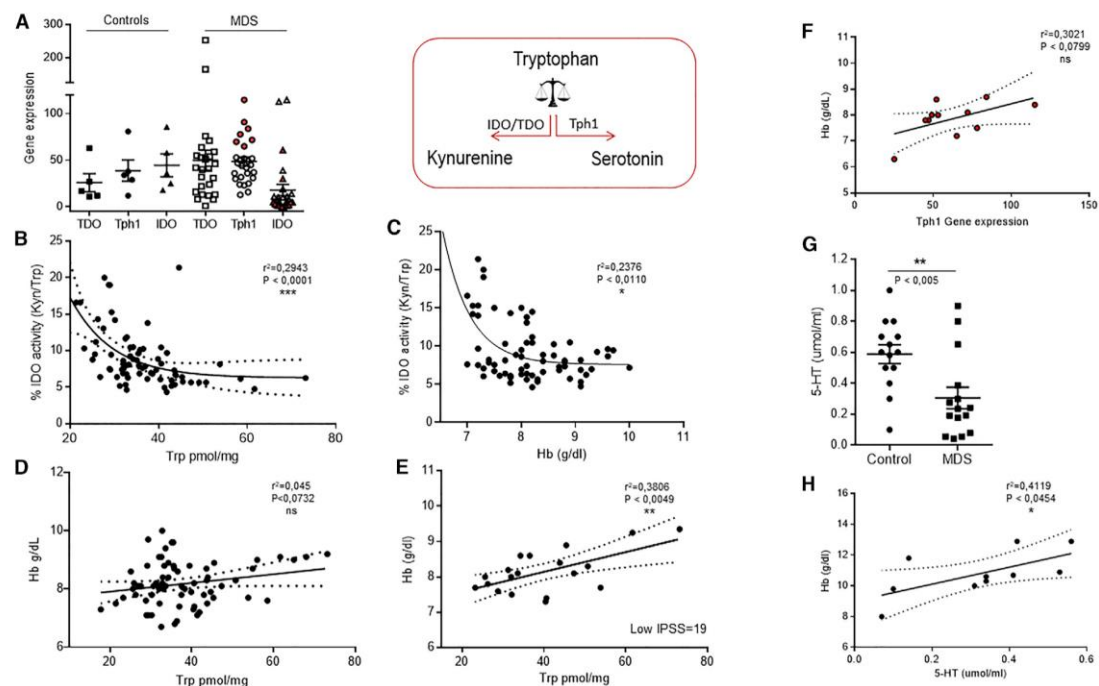


Figure 1. Patients with Low-Risk Myelodysplastic Syndrome Exhibit an IDO/Tph1 Enzyme Activity Imbalance

(A) Gene expression of TDO, TPH1, and IDO in MDS patients ($n = 27$) versus controls ($n = 5$). An inverse relationship between gene expression of *TPH1* and *IDO* is observed in MDS patients as compared to controls. No variation in the expression of TDO is shown.

(B) Inverse correlation between tryptophan levels and IDO activity as measured by kynurenine-to-tryptophan ratio (Kyn/Trp) in plasma of MDS patients ($n = 71$).

(C) Inverse correlation between Hb levels and IDO activity as measured by kynurenine-to-tryptophan ratio (Kyn/Trp) in MDS patients ($n = 71$).

(D and E) No significant correlation (D) between tryptophan and Hb levels in all MDS patients of the cohort ($n = 71$) but significant correlation (E) between tryptophan and Hb levels in MDS patients with lower IPSS ($n = 19$).

(F) Trend toward a positive correlation between high *TPH1* gene expression and Hb level in MDS patients with lower IPSS ($n = 11$ from Figure 1A).

(G) Significant decrease in 5-HT level in blood from MDS patients ($n = 15$) as compared to control individuals ($n = 14$).

(H) Significant correlation between 5-HT and Hb levels in low-risk MDS patients ($n = 10$).

Unpaired t test, Spearman correlation, Mann-Whitney test, and Pearson linear and non-linear regressions were used when appropriate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$.

the physiological dose of EPO (0.2 U/L), addition of 5-HT or the 5-HT_{2A}R agonist (PNU 22394) significantly enhanced the expansion of CD36⁺ cord blood cells (Figures 2D and 2E).

Because tryptophan can be metabolized through the IDO pathway, we also performed an analysis of IDO expression in CD36⁺ cells. Western blot analysis of the protein demonstrated that IDO is highly expressed from day 1 to day 3 of culture after CD36⁺ isolation, and the expression decreases rapidly thereafter. As elevated levels of kynurenine metabolites have been previously proposed to be responsible for inhibition of hematopoietic progenitor amplification, we next investigated whether inhibitors of the kynurenine pathway could function with 5-HT to enhance proliferation of human erythroid progenitors. Figures 2F and 2G demonstrate that, although a decrease in the expression of IDO is observed in the presence of the inhibitor 1-methyl-tryptophan (1-MT), there is no increase in the proliferation of CD36⁺ cells.

Together, the data show the existence of a functional serotonergic system within cells of the erythroid lineage and highlight the importance of the switch between IDO and TPH1 for tryptophan metabolism. At a specific point in time, tryptophan conversion into 5-HT appears to be required for efficient proerythroblast proliferation.

Cell-Autonomous Action of Serotonin Contributes In Vivo to Normal Erythropoiesis

We next identified components of the 5-HT system in murine progenitor cells of the bone marrow and demonstrated the presence of mRNA for Tph1 selectively and highly expressed at the colony-forming unit (CFU)-E-to-pro-erythroblast transition checkpoint (c-Kit⁺/CD71⁺/TER119[−] to c-Kit[−]/CD71⁺/TER119[−]; Figure 3A). Correspondingly, Tph1 enzymatic activity was detected in wild-type (WT) pro-erythroblasts as compared to proerythroblasts derived from *Tph1*^{−/−} animals (Figure 3B). High

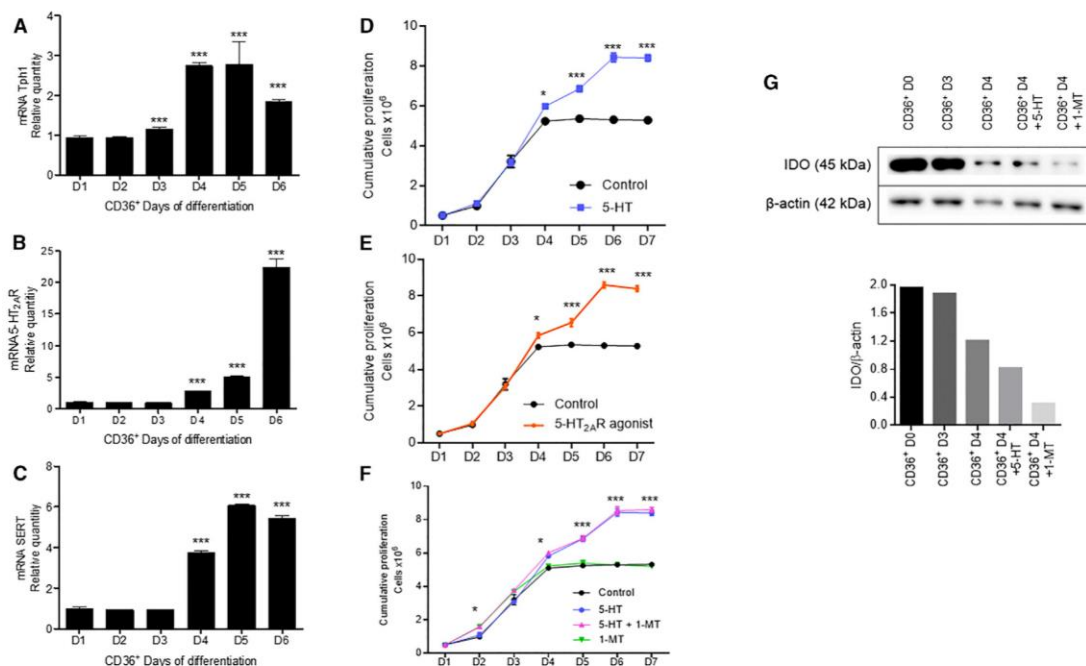


Figure 2. Identification of a Serotonergic System in Human Erythroid Progenitors to Increase Their Proliferation and Survival (A–C) *TPH1* (A), *5-HT_{2A}R* (B), and *SERT* (C) mRNA in cell cultures from human CD36⁺ cord bloods (data are from two independent experiments). (D and E) Use of 5-HT (D) or PNU 22394 (E), a 5-HT_{2A}R agonist, enhances erythroid proliferation (data are from 3 independent experiments). (F) No increase in proliferation of CD36⁺ cells in presence of the IDO inhibitor 1-methyl-tryptophan (1-MT) (data are from 3 independent experiments). (G) Western blot analysis of the protein IDO showed high expression from day 1 to day 3 of culture after CD36⁺ isolation (data are from one experiment). Throughout, data are mean $\pm$ SEM. Paired, unpaired t tests were used when appropriate. *p < 0.05; **p < 0.005; ***p < 0.0005.

levels of mRNA expression encoding for SERT and 5-HT_{2A}R were also seen specifically in the pro-erythroblast population (c-Kit⁺/CD71⁺/TER119⁺), derived from the bone marrow of adult WT mice (2 months old) (Figures 3C and 3D).

We further examined whether 5-HT was present in other hematopoietic organs involved in red blood cell (RBC) production and identified the fetal liver as an additional source of intrinsic nonneuronal or peripheral 5-HT. Analysis of primary cell cultures from WT murine fetal liver (as defined in Socolovsky et al., 2007) demonstrated high expression of *Tph1* mRNA in the pro-erythroblast population, precisely at E13.5, although we observed weak or no expression at other points of development (Figure 3E). We, as well, identified high levels of mRNA expression encoding for the 5-HT_{2A}R and the 5-HT-specific transporter (SERT) in the same population in the fetal liver (Figures 3F and 3G), as seen in the adult bone marrow.

The presence of the enzyme responsible for 5-HT synthesis and key serotonergic components in both human and murine erythroid progenitors support the hypothesis that a local serotonergic network participates to the regulation of erythropoiesis. To better understand the mechanism of action, bone marrow transplant experiments (as illustrated in Figure 3) were performed. The results demonstrated that 5-HT plays a cell-auton-

omous role as the anemic phenotype was transplantable by *Tph1*^{−/−} bone marrow cells in WT mice. Specifically, WT mice that received a transplant from *Tph1*^{−/−} (KO/WT) bone marrow cells had lower bone marrow 5-HT levels associated with a decrease in RBCs and Hb levels, whereas *Tph1*^{−/−} mice that received a transplant from WT bone marrow cells (WT/KO) had normal bone marrow 5-HT levels and presented no anemic phenotype (Figures 3H–3J).

These results are in line with a general mechanism during development and in adult life involving a physiological circuit exerting a cell-autonomous action in hematopoietic organs. Fetal and bone-marrow-derived 5-HT appears to play an essential role at the transition checkpoint (CFU-E to pro-erythroblast) critical for pro-erythroblast expansion and proliferation.

TPH1 Is an Erythroid-Specific Gene under the Control of Erythropoietin

The previous findings identified 5-HT as an important autocrine regulator of erythropoiesis, a process highly dependent on EPO and stem cell factor (SCF) (Wu et al., 1995; Munugalavadi and Kapur, 2005; Kapur and Zhang, 2001). SCF, the ligand for the Kit receptor, plays a predominant role in the expansion of early progenitors, and EPO is crucial in regulating their survival

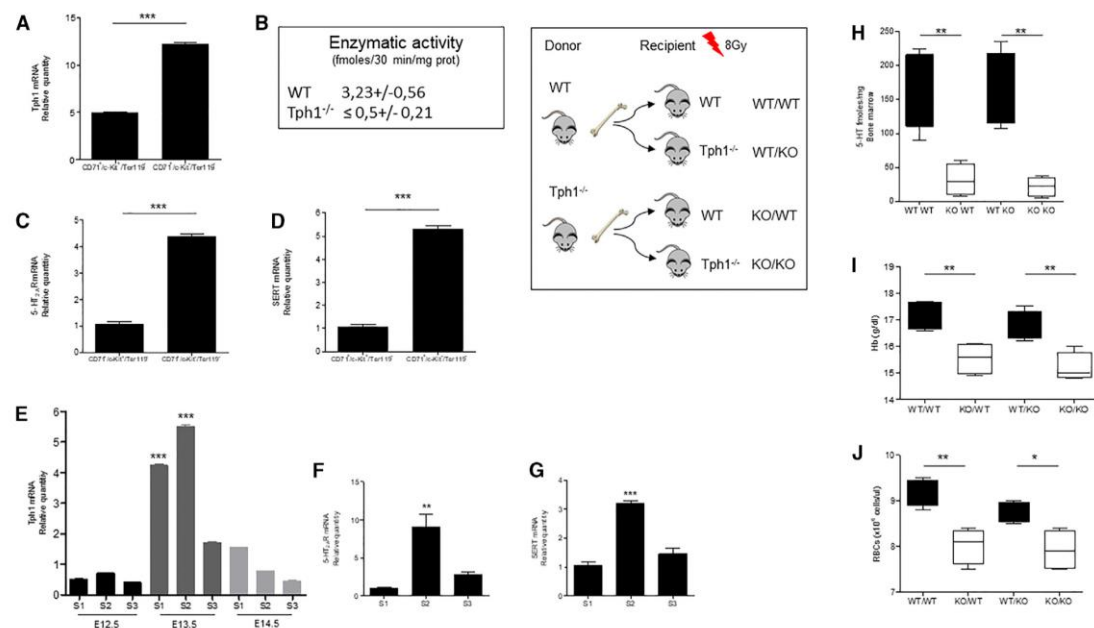


Figure 3. Cell-Autonomous Action of Serotonin Contributes In Vivo to Normal Erythropoiesis

(A–D) *Tph1* mRNA expression (A), *Tph1* enzymatic activity (B), *5-HT_{2A}R* (C), and *SERT* mRNA expression (D) in c-Kit^{+/+}/CD71⁺/TER119⁺ bone-marrow-derived cells from 8- to 10-week-old WT mice (data are representative of 4 independent experiments for A, C, and D and 2 independent experiments for B). (E–G) *Tph1* (E), *5-HT_{2A}R* (F), and *SERT* (*slc6a4*) (G) mRNA expression from S1, S2, and S3 (as described in Socolovsky et al., 2007) sorted cells from E12.5 to E14.5 WT fetal livers (data are representative of 5 independent experiments). (H–J) 5-HT levels (H), Hb levels (I), and RBCs (J) number in WT or *Tph1*^{-/-} mice that received a transplant from WT or *Tph1*^{-/-} (data are from one bone marrow transplantation experiment; n = 4 WT, 4 *Tph1*^{-/-}).

Throughout, data are mean ± SEM. Paired and unpaired t tests were used when appropriate. *p < 0.05; **p < 0.005; ***p < 0.0005.

and proliferation, allowing differentiation of CFU-Es to pro-erythroblasts and further stages of maturation. To investigate whether 5-HT could be considered as an erythroid-stimulating agent in addition to EPO and SCF, murine bone-marrow-derived erythroid progenitors (c-Kit^{+/+}/CD71⁺/TER119⁺) from WT mice were expanded and submitted to various EPO and SCF concentrations. *Tph1* was positively regulated by EPO in a dose-dependent manner both at the mRNA and protein levels (Figures 4A and 4B), and 5-HT synthesis occurred as early as 3 h following EPO stimulation (Figure 4C). Increasing EPO concentration also upregulated *Htr2a* but downregulated *Slc6a4* (Figures 4D and 4E). Next, to identify the signaling pathway, cultured bone-marrow-derived erythroid progenitor cells (c-Kit^{+/+}/CD71⁺/TER119⁺) from WT mice were expanded and submitted to various signal transducer inhibitors. SCF significantly downregulated the expression of *Tph1* and, in the presence of EPO, inhibition of STAT5 downregulated *Tph1* expression, although inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) and mitogen-activated protein (MAP)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathways had no effect, indicating that the Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription protein (STAT) pathway was the main one involved in *Tph1*-positive regulation (Figures 4F and 4G). More-

over, *in silico* analysis of the *Tph1* gene promoter led to the identification of the GATA1, STAT5, and ZBP89 binding sites (see Figure S1), which are key transcription factors involved in the regulation of erythroid-specific gene expression (Socolovsky et al., 2001; Ferreira et al., 2005; Woo et al., 2011). However, follow-up studies are needed to functionally validate that these transcription factors bind to the *Tph1* promoter and act as transcriptional regulator.

Overall, these data demonstrate that *Tph1* is a target gene of the EPO/erythropoietin receptor (EPOR) complex, which—through the orchestration of (1) increased 5-HT synthesis, (2) upregulation of 5-HT_{2A} receptor expression, and (3) downregulation of SERT—possibly raises the concentration of bone marrow 5-HT for local signaling, leading to renewal of erythroid progenitors.

Aged *Tph1*^{-/-} Mice Exhibit Anemia and MDS-like Phenotype

Low-risk MDSs are characterized by macrocytic anemia, dysplastic changes, possibly due to a discrepancy between proliferation and maturation as a result of a cell cycle anomaly of erythroid progenitors that induces multinuclearity, causing enhanced intramedullary death. Because MDS has an

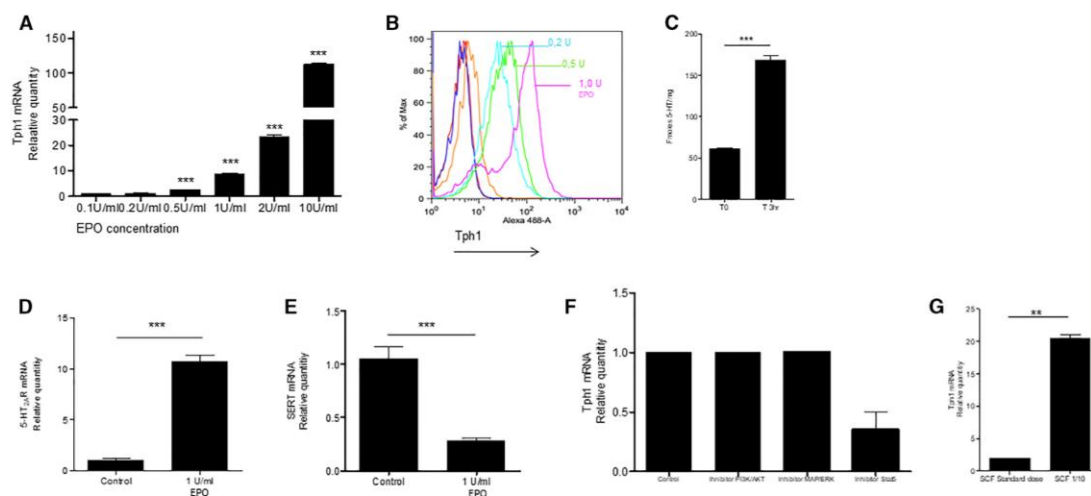


Figure 4. *TPH1* Is an Erythroid-Specific Gene under the Control of Erythropoietin

(A–C) *Tph1* mRNA (A), *TPH1* protein expression (B) following EPO stimulation (red line: no staining, blue line: staining with Tph Ab only; orange line: staining with 2nd Ab goat anti-rabbit immunoglobulin G [IgG] only), and turquoise, green, and pink lines staining with both Ab and (C) 5-HT synthesis following EPO stimulation (data are from 5 independent experiments for A and 2 independent experiments for B and C). (D and E) 5-HT_{2A}R (D) and *SERT* (E) mRNA following EPO stimulation (data are from 4 independent experiments). (F) *Tph1* expression following inhibition of PI3K/Akt, MAP/ERK, and STAT5 signaling pathways (data are from 2 independent experiments). (G) *Tph1* expression with different doses of SCF (data are from 3 independent experiments). Throughout, data are mean ± SEM. Paired and unpaired t tests were used when appropriate. *p < 0.05; **p < 0.005; ***p < 0.0005.

age-related incidence, we specifically analyzed aged *Tph1*^{−/−} mice (>8 months old). Compared to WT mice, *Tph1*^{−/−} mice shared some features with MDS patients, including macrocytic anemia (Figures 5A–5C), peripheral blood cytological alterations with multinuclear, dysplastic cells (May–Grünwald–Giemsa stain; Figure 5D), and ring sideroblasts (Perl’s staining) in bone marrow smears (Figure 5E).

To investigate whether, as seen in MDS patients, a disruption of tryptophan metabolism is occurring in *Tph1*^{−/−} mice, we analyzed metabolites of the kynurenine pathway in cells derived from the bone marrow. As illustrated in Figures 5H–5J, measurements of tryptophan and kynurenine levels are fairly similar to those reported in MDS patients. Specifically, in cells derived from the bone marrow of *Tph1*^{−/−} mice, there was significantly less tryptophan, a slight increase in kynurenine, and a significantly higher Kyn/Trp ratio, suggesting an increase in IDO activity. However, following western blot analysis of IDO in pro-erythroblasts derived from bone marrow of WT and *Tph1*^{−/−} mice, no variation in the expression of IDO was observed between the two genotypes (Figure 5F). In agreement with the previous results, metabolites of the kynurenine pathway (3-hydroxykynurenine [3-HK], xanthuric acid [XA], and nicotinamide adenine [Nad]) were not increased in cells derived from bone marrow of *Tph1*^{−/−} animals as compared to WT (Figures 5K–5M). More importantly, *in vitro* addition of the IDO inhibitor (1-MT) on culture of pro-erythroblasts derived from bone marrow of *Tph1*^{−/−} mice indicated that, in absence of 5-HT, the inhibition of the kynurenine pathway did not result in an increase in proliferation of pro-erythroblasts (red line in Figure 5G). Whereas, as

previously shown (Amireault et al., 2011), addition of 5-HT to pro-erythroblasts derived from bone marrow of *Tph1*^{−/−} mice increased their proliferative capacity (blue line in Figure 5G).

Together, the findings imply that the anemia and MDS-like phenotype observed in 5-HT-deficient mice may not be due to toxicity following an increase of kynurenine metabolites as observed in MDS patients, where the metabolites have been proposed to inhibit hematopoietic progenitor amplification (Berthon et al., 2013). Rather, the findings demonstrate that decreased level of 5-HT available to erythroid progenitors can lead to the emergence of myelodysplastic-related anemia.

Pharmacologic Restoration of 5-HT Is Efficient to Rescue the Anemic Phenotype

We further studied the contribution of the identified source of 5-HT derived from pro-erythroblast cells of the bone marrow and asked whether the cytological features observed in *Tph1*^{−/−} pro-erythroblasts were associated with a defect in proliferation, differentiation, apoptosis, or some other processes (Zhang et al., 2003). We performed flow cytometry analysis (fluorescence-activated cell sorting [FACS]) by studying surface expression of the erythroid cell marker (TER119) and transferrin receptor (CD71; as described in Dussiot et al., 2014). Analysis of erythroid compartments in the bone marrow of aged *Tph1*^{−/−} mice (and of fetal livers; see Figure S2) indicated an overexpansion of pro-erythroblasts and early precursors (i.e., EryA and EryB). This was associated with decreased maturation to late-stage precursors in the bone marrow, leading to reduction of RBC production (EryC; Figure 6A). The results show that the apparent increase in

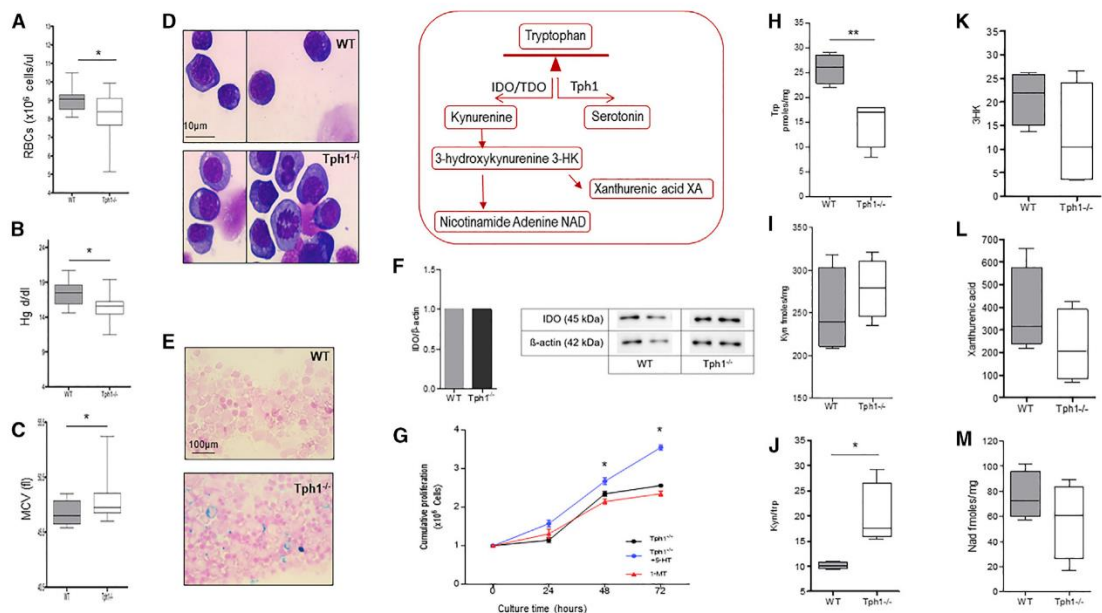


Figure 5. Aged *Tph1*^{-/-} Mice Exhibit Anemia and MDS-like Phenotype

30% of aged *Tph1*^{-/-} mice present with macrocytic anemia.

(A–C) Red blood cell counts (RBCs) (A), hemoglobin (Hb) (B), and mean corpuscular volume (MCV) (C); n = 32 WT; n = 45 *Tph1*^{-/-}.

(D and E) Representative image of bone marrow smears and pro-erythroblasts isolated from WT and *Tph1*^{-/-} mice (D) stained with MGG and Perl's Prussian blue (E).

(F) Western blot analysis showing no increase in IDO expression in pro-erythroblasts derived from *Tph1*^{-/-} mice in relation with actin loading control (data are from one experiment; n = 2 WT; n = 2 *Tph1*^{-/-}).

(G) Inhibition of the IDO enzyme did not increase proliferation of pro-erythroblasts derived from *Tph1*^{-/-} mice (data are from 2 independent experiments).

(H–J) Lower tryptophan level (H) with comparable level of kynurenine (I) and a significant increase in the ratio kynurenine to tryptophan (Kyn/Trp) (J) in cells isolated from the bone marrow of WT and *Tph1*^{-/-} mice (n = 4 WT; n = 4 *Tph1*^{-/-}).

(K–M) Measurements of metabolites of the kynurenine pathway showed no increase in cells derived from bone marrow of *Tph1*^{-/-} mice (n = 4 WT; n = 4 *Tph1*^{-/-}). 3-hydroxykynurenine (3-HK) levels (K), xanthurenic acid (XA) levels (L), and nicotinamide adenine (NAD) levels (M) are shown.

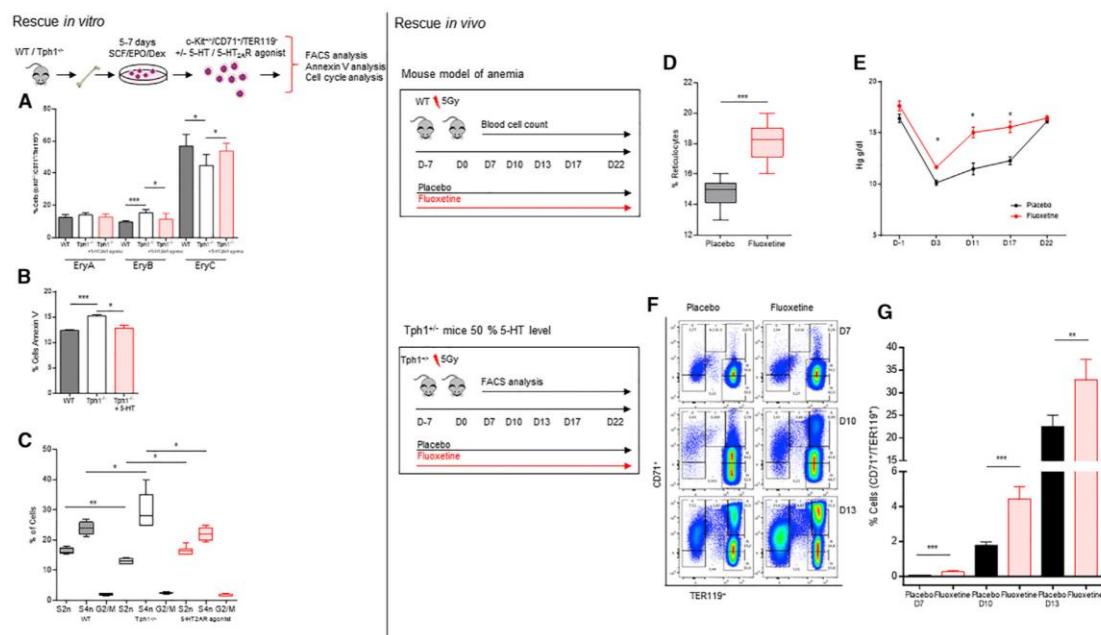
Throughout, data are mean ± SEM. Paired and unpaired t tests were used when appropriate. *p < 0.05; **p < 0.005; ***p < 0.0005.

the population of erythroid progenitors did not translate to more RBCs—due to heightened apoptosis, as revealed by FACS analysis of annexin V from *Tph1*^{-/-} mouse pro-erythroblasts (1.7-fold increase in the pro-erythroblast populations compared with WT animals; Figure 6B). In comparison to our previous results, where no difference was observed in annexin V binding in more mature cells of the erythroid lineage (c-Kit⁺/CD71⁺/Ter119⁺), the use of an improved *in vitro* method revealed an increase in annexin V binding in less mature erythroid progenitors derived from *Tph1*^{-/-} mice (c-Kit⁺/CD71⁺/Ter119⁺) (Dolznig et al., 2006). The findings suggest that the previously observed reduction in the total cellularity of the bone marrow in 5-HT-deficient mice resulted in a decrease in erythroid progenitors due to increased cell apoptosis. The cytological features and the defect in cells proliferation observed in pro-erythroblasts from *Tph1*^{-/-} mice were associated with an accumulation of the cells in S/G₂M phase of the cell cycle (Figure 6C). The presence of the 5-HT_{2A}R on pro-erythroblasts suggested that the effect on proliferation, cell cycle, and apoptosis might directly be mediated through activation of this receptor. Accordingly, *in vitro* addition

of a 5-HT_{2A}R agonist (PNU 22394) or of 5-HT rescued the defects in pro-erythroblasts from *Tph1*^{-/-} mice (Figures 6A–6C right, in pink).

To further understand the *in vivo* mechanism of action of 5-HT signaling on bone marrow cells, we use a well-described physiological model of anemia (Chen, 2005). As illustrated on the left part of Figure 6, WT mice were sub-lethally irradiated and, prior to treatment, were administered the well-known SSRI fluoxetine—a common antidepressant—or a placebo. We hypothesize that treatments with fluoxetine by blocking the action of SERT would lead to increased 5-HT extracellular concentrations and signaling (Olsson and Marcus, 2009). In agreement with our proposal, in WT mice treated with placebo, a prolonged anemia without normalization of Hb until day 22 was observed, whereas, in WT mice treated with fluoxetine, a rapid and significant increase in the number of reticulocytes was observed as early as day 3 and a close to normal Hb level was seen starting on day 11 (Figures 6D and 6E).

We next performed a second set of experiments with heterozygous (*Tph1*^{+/-}) animals. Of importance, *Tph1*^{+/-} mice have



5-HT levels that are 50% of the WT control level, and under steady-state condition, there is a slight, but not significant, decrease in Hb level. Alongside, there is a proliferation defect in pro-erythroblasts cells derived from *Tph1*^{-/-} mice, yet again the differences are not statistically significant (data not shown). As results from Figure 1H revealed a significant correlation between 5-HT and Hb levels in low-risk MDS patients, we hypothesize that individuals with lower 5-HT level may be more at risk to develop MDSs. We performed FACS analysis to identify proliferation and differentiation-stage-specific erythroid progenitors from freshly isolated bone marrow cells derived from *Tph1*^{-/-} mice following sub-lethal irradiation and treated with fluoxetine or placebo. Starting on day 7, a significant increase is observed in the CD71⁺/TER119⁺ population in cells derived from the bone marrow of *Tph1*^{-/-} mice treated with fluoxetine as compared to *Tph1*^{-/-} mice treated with placebo (Figures 6F and 6G). Combined with the increase in erythroid progenitors and precisely on day 7 of treatment, we measured a significant increase in

5-HT levels (nM) in cells derived from the bone marrow of *Tph1*^{-/-} mice treated with fluoxetine as compared to placebo (0.654 ± 0.023 versus <0.2 ± 0.019).

Altogether, the *in vitro* and *in vivo* results indicate a mechanistic role for 5-HT to ensure proper RBC production. 5-HT protects the erythroid progenitors from apoptosis, specifically at the CFU-E-to-pro-erythroblast transition checkpoint, which involves intense cell division. In the absence of peripheral 5-HT, *Tph1*^{-/-} animals exhibit impaired erythroid-proliferating capacities, morphological abnormalities, increased apoptosis, intramedullary death, and anemia similar to what is observed in patients with low-risk MDS. *In vitro* addition of the 5-HT_{2A}R agonist enhances cellular division of erythroid progenitors to rescue the proliferation defect. *In vivo* pharmacological increase of 5-HT levels through SSRI treatment prolongs and increases 5-HT_{2A}R stimulation, which in turn enhances cellular division of erythroid progenitors also to rescue the proliferation defect and the anemic phenotype.

DISCUSSION

Through the TPH and IDO pathways, the essential amino acid tryptophan is the precursor of important metabolites, including 5-HT and kynurenine. In this study, we confirmed, in cohorts of MDS patients, an increase in IDO activity and enhanced tryptophan breakdown. We further investigated whether, in MDS patients, enhanced IDO activity could result in diversion of the available tryptophan toward the Kyn pathway and deprived cells of 5-HT. As such, impaired erythroid proliferating capacities seen in MDS-related anemia could be explained by low 5-HT levels. Our work revealed lower 5-HT levels in blood of MDS patients, thereby providing evidence that lack of 5-HT can lead to the emergence of myelodysplastic-related anemia. However, the MDS-like phenotype observed in 5-HT-deficient mice does not appear to be due to toxicity following an increase of kynurenine metabolites as previously proposed in MDS patients. Rather the decreased level of 5-HT leads to cell cycle anomaly of erythroid progenitors, causing enhanced intramedullary death. The *in vivo* rescue experiments demonstrating the use of SSRIs to increase extracellular source of 5-HT in the earliest stages of MDS, where ineffective erythropoiesis and anemia are major signs, represent an innovative therapeutic strategy.

Our work as well demonstrated that EPO, the main cytokine for RBCs production, upregulated 5-HT synthesis at a critical transition checkpoint during erythroid progenitors' proliferation (CFU-E to pro-erythroblast). Moreover, the developmental defect and the unsolved significant reduction (15%) in the number of *Tph1*^{-/-} live pups at E13.5 (Amireault et al., 2013) is reminiscent of the phenotype of the EPO knockout, which is lethal for E13.5 embryos (Wu et al., 1995). A combined action between EPO and 5-HT is thus likely for efficient proliferation of erythroid progenitors and consistent with our previous result showing higher levels of EPO in the serum of adult *Tph1*^{-/-} mice yet without any erythropoietic response (Amireault et al., 2011).

The identification of a serotonergic system in erythroid progenitors is an additional indication for the concept of "microserotonergic systems," where locally restricted 5-HT synthesis plays a predominant role in comparison to the traditional view of 5-HT as a pleiotropic hormone synthesized in the gut, taken up by platelets and distributed throughout the entire organism (reviewed in Amireault et al., 2013 and Spohn and Mawe, 2017). The data are consistent with those of Kirouac and colleagues (2010), who reported that hematopoietic stem cells expansion correlated with G-protein-coupled receptors neurotransmitter signaling (especially members of the 5-HT_{2R} family) in regulating stem cell fate. The authors proposed that the signal of nonneuronal origin was activated endogenously by hematopoietic progenitor cells rather than by infiltrating distant cells (Kirouac et al., 2010). Although we do not exclude that neuronal 5-HT might exert its activity on hematopoietic stem and progenitor cells proliferation, our results established the direct effect of locally derived 5-HT on erythroid progenitors that does not require any downstream effectors signal, such as the hypothalamic, pituitary, adrenal axis observed in zebrafish embryos (Kwan et al., 2016). Also, even though we have identified proerythroblasts as a source of 5-HT in the bone marrow, we cannot exclude that additional cell types of the hematopoietic lineage

are capable of synthesizing 5-HT. Nevertheless, in contrast to a suggested role played by neuronal 5-HT on hematopoietic stem and progenitor cells during murine early development (Lv et al., 2017), we have identified two sources of nonneuronal or peripheral 5-HT and provide pharmacological and genetic evidences for 5-HT synthesis in a specific erythroid progenitor cell type at a critical transition checkpoint.

With reference to 5-HT and its well-known effect on mood—low levels being associated with the onset of depression—a recent publication by Vulser et al. (2016) showed a robust association between depression and anemia, offering further support to the emerging link between decreased levels of 5-HT and anemia. Along that line, it is tempting to speculate that, in patients with anemia, SSRI could be used and particularly for the group of MDS patients not responding to EPO treatment. For instance, in RARS patients, a subgroup of low-risk MDS, EPO treatment is usually inefficient to improve anemia. Likewise, a retrospective cohort analysis suggested that low-risk MDS patients may benefit from SSRI treatment, as improvement in overall survival was observed among patients diagnosed with low-risk MDS treated with SSRIs, including fluoxetine (Li et al., 2017). If our findings are further validated by the ongoing clinical trial (NCT02452983), the proposal to target the serotonergic network in the earliest stages of MDS, where anemia is a major sign, may indeed represent a therapeutic intervention.

In summary, our study led to significant advances in understanding of the molecular mechanisms that could be targeted in MDSs. The identification of drugs to improve ineffective erythropoiesis at initial stages of MDS will contribute to reduce the need for transfusions and the transfusion-related risks and importantly improve the quality of life of patients suffering from erythroid disorders, including MDS.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Mouse models
 - Animal procedures
 - Patients
 - Human cell studies
- METHOD DETAILS
 - Cell culture
 - Measurements of 5-HT, tryptophan, kynurenine Levels by HPLC
 - RT qPCR
 - RNA-sequencing
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
 - Statistical analysis

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found with this article online at <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.071>.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Aurelia Dujardin (LEAT Institut *Imagine*) and Corinne Cordier, Jérôme Mégret, and Olivier Pellé for their help with cell sorting (SFR Necker). This work was supported in part by grants from Laboratory of Excellence GR-Ex, reference ANR-11-LABX-0051. The labex GR-Ex is funded by the program "Investissements d'avenir" of the French National Research Agency, reference ANR-11-IDEX-0005-02. T.C. was supported by a PhD fellowship from Institut Imagine. D.S. was supported by a post-doctoral fellowship from INSERM, and J.R. was supported by a PhD fellowship from the Ministère Supérieur de l'Enseignement et de la Recherche. L.M. received support from the Centre National de la Recherche Scientifique; the INSERM; the Sorbonne Université Sciences; and by grants from the Fondation pour la Recherche sur le Cerveau, the Fondation de France, the Fondation pour la Recherche Médicale "Equipe FRM DEQ2014039529," ANR-17-CE16-0008, and the Investissements d'Avenir programme ANR-11-IDEX-0004-02) as part of the Bio-Psy Labex. Funding from Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) MDS-04, INCa-DGOS 5480 (to M.F.) was also received. The authors would also like to thank Jason Miller for editing of the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, D.S., T.C., J.R., O.H., and F.C.; Methodology, D.S., T.C., J.R., M.L., E.B., G.F., R.R., S.T., P.B., F.B., M.D., K.D., L.L., J.C., J.-M.L., L.M., C.V., G.C., and F.C.; Resources, O.K. and M.F.; Writing—Review & Editing, T.C., O.H., and F.C.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: April 18, 2018

Revised: December 30, 2018

Accepted: February 20, 2019

Published: March 19, 2019

REFERENCES

- Amireault, P., Hatia, S., Bayard, E., Bernex, F., Collet, C., Callebort, J., Launay, J.-M., Hermine, O., Schneider, E., Mallet, J., et al. (2011). Ineffective erythropoiesis with reduced red blood cell survival in serotonin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 13141–13146.
- Amireault, P., Sibon, D., and Côté, F. (2013). Life without peripheral serotonin: insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks. *ACS Chem. Neurosci.* 4, 64–71.
- Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M., and Vardiman, J.W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127, 2391–2405.
- Berthon, C., Fontenay, M., Corm, S., Briche, I., Allorge, D., Hennart, B., Lhermitte, M., and Quesnel, B. (2013). Metabolites of tryptophan catabolism are elevated in sera of patients with myelodysplastic syndromes and inhibit hematopoietic progenitor amplification. *Leuk. Res.* 37, 573–579.
- Cazzola, M., and Malcovati, L. (2005). Myelodysplastic syndromes—coping with ineffective hematopoiesis. *N. Engl. J. Med.* 352, 536–538.
- Chen, J. (2005). Animal models for acquired bone marrow failure syndromes. *Clin. Med. Res.* 3, 102–108.
- Chen, Y., and Guillemin, G.J. (2009). Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy States. *Int. J. Tryptophan Res.* 2, 1–19.
- Côté, F., Thévenot, E., Fligny, C., Fromes, Y., Darmon, M., Ripoche, M.-A., Bayard, E., Hanoun, N., Saurini, F., Lechat, P., et al. (2003). Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 13525–13530.
- D'Aveni, M., Rossignol, J., Coman, T., Sivakumaran, S., Henderson, S., Manzo, T., Santos e Sousa, P., Bruneau, J., Fouquet, G., Zavala, F., et al. (2015). G-CSF mobilizes CD34+ regulatory monocytes that inhibit graft-versus-host disease. *Sci. Transl. Med.* 7, 281ra42.
- Dolznic, H., Grebien, F., Deiner, E.M., Stangl, K., Kolbus, A., Habermann, B., Kerenyi, M.A., Kieslinger, M., Moriggl, R., Beug, H., and Müller, E.W. (2006). Erythroid progenitor renewal versus differentiation: genetic evidence for cell autonomous, essential functions of EpoR, Stat5 and the GR. *Oncogene* 25, 2890–2900.
- Dussiot, M., Maciel, T.T., Fricot, A., Chartier, C., Negre, O., Veiga, J., Grapton, D., Paubelle, E., Payen, E., Beuzard, Y., et al. (2014). An activin receptor IIA ligand trap corrects ineffective erythropoiesis in β receptor IIA. *Nat. Med.* 20, 398–407.
- Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M., and Philipsen, S. (2005). GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1215–1227.
- Greenberg, P., Cox, C., LeBeau, M.M., Fenaux, P., Morel, P., Sanz, G., Sanz, M., Vallespi, T., Hamblin, T., Oscier, D., et al. (1997). International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89, 2079–2088.
- Hannon, J., and Hoyer, D. (2008). Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav. Brain Res.* 195, 198–213.
- Kapur, R., and Zhang, L. (2001). A novel mechanism of cooperation between c-Kit and erythropoietin receptor. Stem cell factor induces the expression of Stat5 and erythropoietin receptor, resulting in efficient proliferation and survival by erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 276, 1099–1106.
- Kirouac, D.C., Ito, C., Csaszar, E., Roch, A., Yu, M., Sykes, E.A., Bader, G.D., and Zandstra, P.W. (2010). Dynamic interaction networks in a hierarchically organized tissue. *Mol. Syst. Biol.* 6, 417.
- Kwan, W., Cortes, M., Frost, I., Esain, V., Theodore, L.N., Liu, S.Y., Budrow, N., Goessling, W., and North, T.E. (2016). The central nervous system regulates embryonic HSPC production via stress-responsive glucocorticoid receptor signaling. *Cell Stem Cell* 19, 370–382.
- Li, A., Yellapragada, S.V., Mims, M., Frolov, A., and Rivero, G.A. (2017). Significant improvement in overall survival among patients diagnosed with low-risk myelodysplastic syndrome treated with selective serotonin reuptake inhibitors. *Br. J. Haematol.* 177, 142–144.
- Lv, J., Wang, L., Gao, Y., Ding, Y.Q., and Liu, F. (2017). 5-hydroxytryptamine synthesized in the aorta-gonad-mesonephros regulates hematopoietic stem and progenitor cell survival. *J. Exp. Med.* 214, 529–545.
- Malcovati, L., and Cazzola, M. (2016). Recent advances in the understanding of myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts. *Br. J. Haematol.* 174, 847–858.
- Malcovati, L., Porta, M.G.D., Pascutto, C., Invernizzi, R., Boni, M., Travaglino, E., Passamonti, F., Arcaini, L., Maffioli, M., Bernasconi, P., et al. (2005). Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J. Clin. Oncol.* 23, 7594–7603.
- Mufti, G.J., Bennett, J.M., Goasguen, J., Bain, B.J., Baumann, I., Brunning, R., Cazzola, M., Fenaux, P., Germing, U., Hellström-Lindberg, E., et al.; International Working Group on Morphology of Myelodysplastic Syndrome (2008). Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica* 93, 1712–1717.
- Munugalavada, V., and Kapur, R. (2005). Role of c-Kit and erythropoietin receptor in erythropoiesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 54, 63–75.
- Olfson, M., and Marcus, S.C. (2009). National patterns in antidepressant medication treatment. *Arch. Gen. Psychiatry* 66, 848–856.
- Oxenkrug, G.F. (2010). Tryptophan kynurenine metabolism as a common mediator of genetic and environmental impacts in major depressive disorder: the serotonin hypothesis revisited 40 years later. *Isr. J. Psychiatry Relat. Sci.* 47, 56–63.
- Platten, M., Wick, W., and Van den Eynde, B.J. (2012). Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion. *Cancer Res.* 72, 5435–5440.

- Socolovsky, M., Nam, H., Fleming, M.D., Haase, V.H., Brugnara, C., and Lodish, H.F. (2001). Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* 98, 3261–3273.
- Socolovsky, M., Murrell, M., Liu, Y., Pop, R., Porpiglia, E., and Levchenko, A. (2007). Negative autoregulation by FAS mediates robust fetal erythropoiesis. *PLoS Biol.* 5, e252.
- Spohn, S.N., and Mawe, G.M. (2017). Non-conventional features of peripheral serotonin signalling - the gut and beyond. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14, 412–420.
- Vulser, H., Wiernik, E., Hoertel, N., Thomas, F., Pannier, B., Czernichow, S., Hanon, O., Simon, T., Simon, J.-M., Danchin, N., et al. (2016). Association between depression and anemia in otherwise healthy adults. *Acta Psychiatr. Scand.* 134, 150–160.
- Walther, D.J., Peter, J.-U., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Voits, M., Fink, H., and Bader, M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 299, 76.
- Woo, A.J., Kim, J., Xu, J., Huang, H., and Cantor, A.B. (2011). Role of ZBP-89 in human globin gene regulation and erythroid differentiation. *Blood* 118, 3684–3693.
- Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., and Lodish, H.F. (1995). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 83, 59–67.
- Zermati, Y., Fichelson, S., Valensi, F., Freyssinier, J.M., Rouyer-Fessard, P., Cramer, E., Guichard, J., Varet, B., and Hermine, O. (2000). Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. *Exp. Hematol.* 28, 885–894.
- Zermati, Y., Garrido, C., Amsellem, S., Fishelson, S., Bouscary, D., Valensi, F., Varet, B., Solary, E., and Hermine, O. (2001). Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J. Exp. Med.* 193, 247–254.
- Zhang, J., Socolovsky, M., Gross, A.W., and Lodish, H.F. (2003). Role of Ras signaling in erythroid differentiation of mouse fetal liver cells: functional analysis by a flow cytometry-based novel culture system. *Blood* 102, 3938–3946.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
CD71 FITC	BD PharMingen	Cat# 553266; RRID:AB_394743
TER119 PE	BD PharMingen	Cat# 553673; RRID:AB_394986
c-Kit APC	BD Biolegend	Cat# 105811; RRID:AB_313220
Antibody Tph1	Abcam	Cat# ab52954; RRID:AB_2207555
IDO	BioLegend	Cat# 122402; RRID:AB_2280140
DyLight 488 goat anti-rabbit IgG	Abcam	Cat# ab96899; RRID:AB_10679361
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Fluoxetine	Prozac® 20mg/5mL soln	N/A (Necker Hospital)
Erythropoietin		N/A (Necker Hospital)
1-methyl-tryptophan	Sigma-Aldrich	Cat# 860646
Pimozide		Cat# P1793
StemPro-34 serum-free stem cell expansion medium	Thermo Fischer Scientific	Cat# 10639011
Stem Cell factor	Immunotools	Cat# 12343323
Dexamethasone	Sigma	Cat# D1756
Annexin V	BD Biosciences	Cat# 556419; RRID:AB_2665412
PNU 22394 HCl	Tocris Bio-Science	Cat# 2201-10
5-HT HCl	Sigma	Cat# H9623
Critical Commercial Assays		
BrdU flow kit	BD Biosciences	5 Cat# 59619
Experimental Models: Cell Lines		
Human CD34 cord blood cells	This paper	N/A
Mouse Pro-erythroblasts	This paper	N/A
Experimental Models: Organisms/Strains		
Tph1 KO mice	Côté et al., 2003	N/A
Oligonucleotides		
Primers Tph1 mouse	Life technologies	Cat# Mm01202614_m1
Primers Tph1 human	Life technologies	Cat# Hs00188220_m1
Primers SERT human	Life technologies	Cat# Hs00984349_m1
Primers SERT mouse	Life technologies	Cat# Mm00439391_m1
Primers GAPDH mouse	Life technologies	Cat# Mm99999915_g1
Primers 18S transcript mouse	Life technologies	Cat# Mm03928990_g1
Primers GAPDH human	Life technologies	Cat# Hs03929097_g1
Primers 18S transcript human	Life technologies	Cat# Hs99999901_s1
Primer 5-HT2AR human	Life technologies	Cat# Hs01033524_m1
Primers 5-HT2AR mouse	Life technologies	Cat# Hs01566408_m1
RNA seq: data will be made available upon request		N/A

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Francine Côté, francine.cote@parisdescartes.fr.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Mouse models

For all experiments animals were housed 5 mice/cage. Tph1^{-/-} mice were generated as described (Côté et al., 2003). Tph1^{-/-}, Tph1^{+/-} and WT animals (males and females) were derived from pure C57BL/6J genetic backgrounds. For some experiments, C57/bl6 mice (males and females) were purchased from Janvier Labs (CS 4105 LE GENEST ST ISLE, SAINT BERTHEVIN Cedex France). For all experiments, littermates of the same sex were randomly assigned to experimental groups. Mice were given *ad libitum* access to food and water with a 12 hours light/ 12 hours dark cycle.

For experiments involving mouse embryos, Tph1 wild-type, heterozygous, and homozygous males (10-12 weeks old) bred to Tph1 wild-type, heterozygous, and homozygous females (10-12 weeks old).

For *in vivo* experiments involving fluoxetine and sub-lethal irradiation, WT mice and Tph1^{+/-} were used (males and females 8-10 weeks old and 8 months old). For bone marrow transplantation experiments, WT females and Tph1^{-/-} 8-10 week's old female mice were used. For murine erythroid *in vitro* cell culture and immunophenotyping of murine erythroid precursors, cells were obtained from fetal livers or flushed from femur/tibia (WT and Tph1^{-/-} males and females 8-10 weeks old and 8 months old).

Animal procedures

Tph1^{-/-} mice were generated as described (Côté et al., 2003). Tph1^{-/-}, Tph1^{+/-} and WT animals (males and females) were derived from pure C57BL/6J genetic backgrounds. For some experiments, C57/bl6 mice (males and females) were purchased from Janvier Labs (CS 4105 LE GENEST ST ISLE, SAINT BERTHEVIN Cedex France). Animal experiments were performed according to the recommendations of the French Institutional Committee (A75-15-34).

Blood counts

To analyze blood counts, peripheral blood from the tail vein was collected in EDTA tubes and analyzed using an electronic hematology particle counter (type MS9-5; Melet Schloesing Laboratories).

Embryos

Embryos were obtained from crosses between Tph1 wild-type, heterozygous, and homozygous males bred to Tph1 wild-type, heterozygous, and homozygous females (8-10 weeks old). The day at which the vaginal mating plug was seen was taken as E0.5. Mice were sacrificed by cervical dislocation; the fetal livers were removed from E10.5 to E18.5 and stained with appropriate antibodies. For BrdU incorporation, pregnant females were injected i.p. a dose of BrdU (1 mg) dissolved in PBS 2 hours before sacrifice. For cell cycle analysis, BrdU incorporation level in CD71⁺/c-Kit⁺/TER119⁻ cells was assessed using a BrdU flow kit according to the manufacturer's instructions (BD PharMingen). For RT-qPCR analysis, CD71⁺/c-Kit⁺/TER119⁻ cells were isolated from fetal livers using a FACS-AriaII cell sorter (BD Biosciences).

Fluoxetine treatment

Fluoxetine was administrated orally (40 mM in water bottle (Prozac® 20mg/5mL solution) to WT mice and Tph1^{+/-} (males and females 8-10 weeks old C57/bl6 purchased from Janvier labs) for 7 days before inducing anemia and continue throughout the experiment.

Sub-lethal irradiation

Sub-lethal irradiation was induced by submitting WT or Tph1^{+/-} mice to 1.09 Gy during 4 minutes (WT C57/bl6 Males 8-10 weeks old purchased from Janvier labs for Figures 6D and 6E). For Figures 6F and 6G Tph1^{+/-} mice were males and females > 8 months old.

Bone marrow transplantation experiment

Bone marrow transplantation was performed as described in D'Aveni et al., 2015.

Histological analysis

For histology, tissues were fixed in 10% formalin overnight, embedded in paraffin blocks, and sectioned (5 µM). Sections were stained with Prussian blue. Smears and culture of pure pro-erythroblasts cells (c-Kit⁺/CD71⁺/TER119⁻) derived from bone marrow of WT and Tph1^{+/-} aged mice (males and females > 8 months old) were stained with May-Gruenwald Giemsa for analysis.

Patients

Low and int-1 MDS patients (n = 71) were enrolled after they gave their informed consent according to the recommendations of the institutional ethics committee (CPP Ile-de-France X). Peripheral blood plasma (n = 71) and bone marrow RNA (n = 27) were obtained at diagnosis for tryptophan and kynurenine dosages, and for RNA-sequencing, respectively. Plasmas and bone marrows from age-matched subjects were used as controls. For 5-HT measurements, whole blood was collected from MDS patients (n = 15; 9 men, 6 women) and aged-matched controls (n = 14) on sodium-citrate tubes. For the RNA seq experiment (Figure 1A), n = 27; 22 men, 5 women. For the IDO, Hb, Trp measurement (Figures 1B-1E) n = 71; 48 men, 23 women.

Human cell studies

Cord blood samples were collected from umbilical veins following normal full-term vaginal deliveries and processed within 24 hours. Erythroid cells were generated from CD34⁺ cord blood progenitor cells.

METHOD DETAILS

Cell culture

Murine Erythroid in Vitro Cell Culture

Cells from fetal livers or flushed from femur/tibia were grown in StemPro-34 serum-free stem cell expansion medium supplemented with human recombinant EPO (1 U/mL), murine recombinant stem cell factor (100 ng/mL) (Immunotools), and dexamethasone (1 μ M) (Sigma). After 5–7 days in StemPro-34, a culture of pure pro-erythroblasts was obtained. In some conditions, 5-HT HCl (1 μ M; Sigma), PNU 22394 HCl (1 μ M) (Tocris Bio-Science) and 1-methyl-tryptophan (1-MT) (Sigma) was added to the proliferation/differentiation medium. Proliferation was monitored by cell counts. Treatment of CD71⁺/c-Kit^{+/−}/TER119[−] mouse bone marrow cells for 2–4 hours with STAT5 inhibitors (10 μ M pimozone, Sigma), followed by RT-qPCR analysis for *Tph1* mRNA. Apoptosis was measured using APC-labeled annexin V (BD PharMingen) following staining with cell surface markers. For TPH1 protein expression, CD71⁺/c-Kit^{+/−}/TER119[−] cells derived from the bone marrow were stained with the tryptophan hydroxylase antibody (ab52954; Abcam, Cambridge, England) according to the manufacturer's protocol. Briefly, CD71⁺/c-Kit^{+/−}/TER119[−] were fixed with 80% methanol (5 minutes) and then permeabilized with 0.1% PBS-Tween for 20 minutes. Cells were then incubated in 1X PBS/10% normal goat serum followed by the antibody (ab52954, 1:100 dilution) for 30 minutes at room temperature. The secondary antibody used was DyLight 488 goat anti-rabbit IgG (ab96899) at 1:500 dilution for 30 minutes at room temperature. Isotype control antibody was rabbit IgG (monoclonal) used under the same conditions. Cells were analyzed on a FACS Cantoll coupled with FlowJo software version X.0.7 (Tree Star, Ashland, OR).

Cell cycle analysis

For cell cycle analysis, BrdU incorporation level in CD71⁺/c-Kit^{+/−}/TER119[−] cells was assessed using a BrdU flow kit according to the manufacturer's instructions (BD PharMingen). For RT-qPCR analysis, CD71⁺/c-Kit^{+/−}/TER119[−] cells were isolated from bone marrow using a FACS-Ariall cell sorter (BD Biosciences).

Human cord blood Erythroid in Vitro Cell Culture

Erythroid cells were generated from CD34⁺ cord blood progenitor cells in serum-free medium in the presence of EPO (2 mU/ml) + IL-3 (10 ng/ml) + stem cell factor (SCF; 50 ng/ml) as previously described in Zermati et al., (2000, 2001). The study was performed according to the Helsinki Declaration with the approval from the ethics committee of our institution (Comité de Protection des personnes (CPP) "Ile de France II"). All patients gave written informed consent. Cord blood samples were collected from umbilical veins following normal full-term vaginal deliveries and processed within 24 hours.

Immunophenotyping of Murine Erythroid Precursors

Cells from fetal livers or BM cells flushed from femur and tibia were resuspended in Hank's buffered saline before being passed through a 100- μ m strainer. Cells were washed, counted, and immunostained at room T° in PBS with PE-conjugated anti-TER119, FITC-conjugated anti-CD71 and APC-conjugated anti-CD117 (c-Kit) (BD PharMingen and BioLegend) antibodies for 20 min and analyzed on a FACS Canto II coupled with FlowJo software version X.0.7 (Tree Star, Ashland, OR).

Measurements of 5-HT, tryptophan, kynurenine Levels by HPLC

Tph1^{−/−} and WT littermates were sacrificed by cervical dislocation and the femur/tibia were removed, weighed, and sonicated for 5 s in 10 volumes (vol/wt) of 0.1 N perchloric acid 0.05% disodium EDTA 0.05% sodium metabisulfite. 5-HT was extracted, and 10- μ l samples were injected onto a Beckman Ultrasphere 5- μ m IP column (Beckman). Eluted 5-HT, tryptophan, kynurenine, hydroxykynurenine, xanthurenic acid and nicotinamide adenine were quantified electrochemically (at 0.65 V) and concentrations were calculated in nanograms per gram of tissue or in μ mol/ml plasma/serum 5-HT).

RT qPCR

Total RNA was extracted from fetal liver cells, bone marrow cells and CD34⁺/CD36⁺ cord blood cells using the RNeasy Kit (QIAGEN). Reverse transcription was performed using iScript Reverse Transcription Supremix for RT-qPCR (BioRad). Real time PCR was performed on a STEPONE cycling machine (Applied Biosystems) using oligos from Taqman (Life technologies). Two biological replicates were used for each condition. Data were analyzed by StepOne Plus RT PCR software v2.1 and Microsoft excel. β -actin, GAPDH and 18S transcript levels were used for normalization of each target (= Δ CT). Real-time PCR CT values were analyzed using the 2^{−(ΔΔCT)} method to calculate the fold expression ($\Delta\Delta$ CT method).

RNA-sequencing

Libraries were constructed using the TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA) and sequenced on an Illumina HiSeq 2500 platform using a 100-bp paired-end sequencing strategy. An average depth of global sequence coverage of 114 million and a median coverage of 112 million was attained. For analysis, TopHat (v2.0.6) was used to align the reads against the human reference genome Hg19 RefSeq (RNA sequences, GRCh37) downloaded from the UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>). The read counts were transformed by voom from the Limma R package which converts the counts to log-counts per million with associated precision weights and flags were computed using a custom algorithm within R as follows. Assuming that a maximum of 80% of genes are expressed, we select the 20% lowest counts for each sample as background. A threshold is fixed at two standard deviations over the mean of the background. All transcripts for which normalized counts were lower than the

computed threshold were designated as background for each array. When comparing normalized counts between two groups, a transcript was included in the analysis if its counts exceeded the background. Normalized data were used to estimate the expression of selected genes.

Data will be made available upon request.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software. Throughout data are mean $\pm$ SEM. Unpaired t test, Spearman correlation, Mann-Whitney test and Pearson linear and non-linear regressions were used when appropriate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$.

Supplemental Information

Enhanced Renewal of Erythroid Progenitors in Myelodysplastic Anemia by Peripheral Serotonin

David Sibon, Tereza Coman, Julien Rossignol, Mathilde Lamarque, Olivier Kosmider, Elisa Bayard, Guillemette Fouquet, Rachel Rignault, Selin Topçu, Pierre Bonneau, Florence Bernex, Michael Dussiot, Kathy Deroy, Laetitia Laurent, Jacques Callebert, Jean-Marie Launay, Sophie Georgin-Lavialle, Geneviève Courtois, Luc Maroteaux, Cathy Vaillancourt, Michaela Fontenay, Olivier Hermine, and Francine Côté

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental Figures S1-S2

Tph1: *Mus musculus*

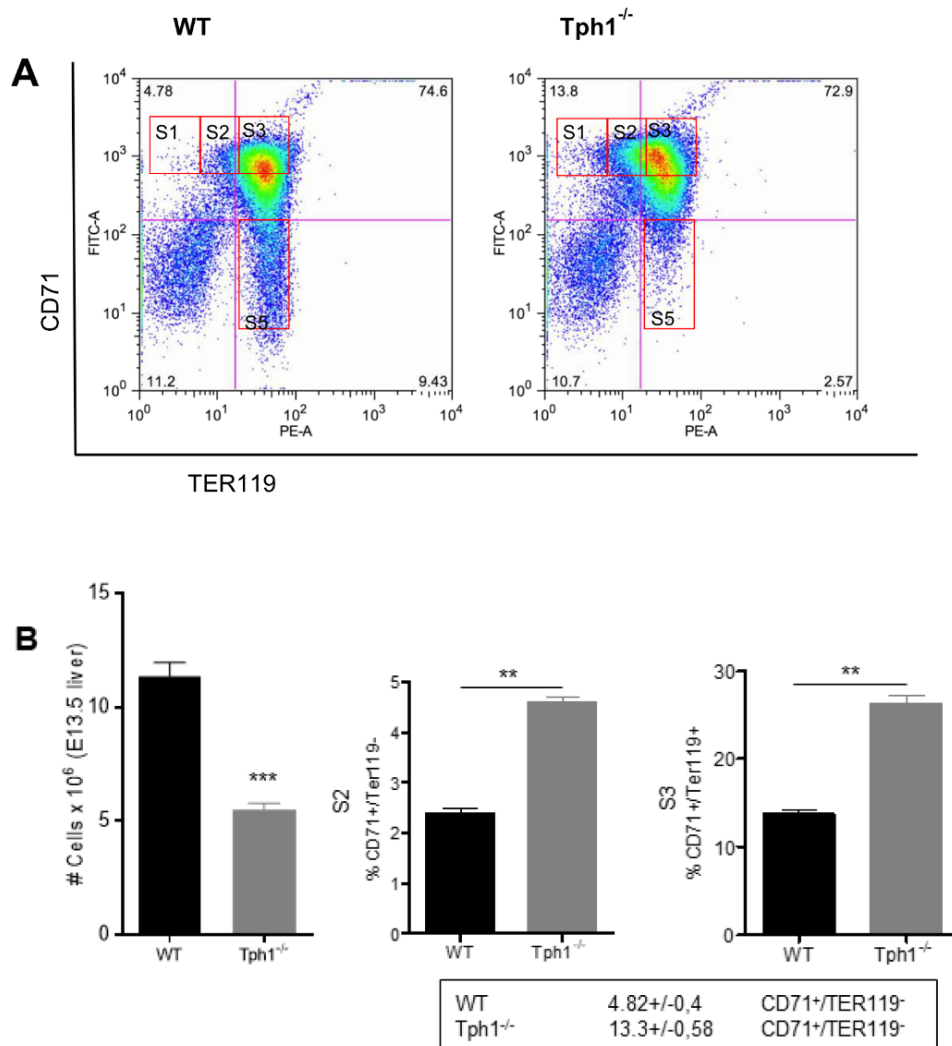
GGTAGAAAGCGAGAAAGTACTCTGCAAGTTGCTCTGGCCTTTGTATAT
GCATCATCATGTGTGTGCTAAATACACATAATAGAAAAAGATACATGGCAG
AGAAGTGGGGGTGGGAGCTATATGCTCAGGCTGGTTCAGAGAGGCTCA
GGGACATTTCTAGCTTTTCTAGCCCACTAACATGGCCCAACATCAGCTTTT
CCATCAAATGCTCATTAAACGGATTGGCTTCATCTCTTTTTTTAAGTGGGGC
AGTTCATGTCTTTGTAGATACCCAGCTTGGGAATGGCAGCTTGACTTCAGC
TTGGTCCCAAGTCACTCTGGCCTCTGTTTTATGTTGATTGAGCAAGAACACA
GGACCTCAAATCAGAATGCTTTTGTCTTCTTCTCACTAACCCATGCAGG
AGGAGGCTGTAGAGCTGTTGCTATGGGCCCCAGTTTGTGATCTATAATGC
AAGCACAAATTTTTAAATCCATCGAATTATTCTAAAGATAAAGGAAAAA
CTATAAGGGGGTTTGAATCATGGGCATCTGCAATTTGAGATCGGACAAG
TTGGTGCCAATAATCTCAAATTGGAAGGGTGGGCAGGGAGGTTGTGTGA
GTTCAAGGCCAGCCTGGGCTACAGAGCAAGCAAGACCCGACTGAACCTTC
ACATAGCACCCTGCAATACATGCACATTGAGCCAGGGGACTGACAACCTGT
GCAAACTGAAGTTCAAAGCACTGTGATGTGTGCTGGCACAAGTCCC
ACAGCCTCTGAAGCATCCATGTCCCTCAAGTTCAGGAAAGGTGAAATA
ACAGAAAGAGAATCAGGTCAGCGCTGTCCCTGGGAATCAGGGGCCGTCG
GGGAGAAGACTGAGACAAGCAATACCTTTGGAGGGTGGGAATATCTGTA
TTTGATCGTTTGGTGTAGTGGTTACGTACTTGACAAGTGGATCAACTTGTG
AAGACTCAGAAATGTACACCTCAGAAAAGCGGATGTTCCGCCATACAGAT
GGCTTATCTTGAATCTCAGCACTGGAGAGGGAGAGGAGAGAGAGGAGC
ATTGTTGAGTTCTAGGCCAGCATTGGTTGCTTGTGCACTTTTTCTTGTAA
GTCAAGGCAGCACTATTTTATATATGTACATAGCAGTTAGATTGCATTGG
GTATGACAAATAATCTAAGATGAAGCCTACAGGATATATGCATGCTATGAT
ACATCTTTTATAACAGCCCGGAGCATCCCCAGACTCTGGCATCTAGAAGTG
TCCTAAGACTAGTCCCCAGGATACAGAGGGACCATGCTTTGGTCTTTAGT
AGAGCGTCTAATAACGGATCGTCAACAGATAATGCTATTGGCTTCTG
AGCCGAGTTCGTATAGCAGGGAAGTGATATTTTCAAGCAGGCACAGCATCGT
TATCTGCGTGATCGTACATTTCTTTTCTTTTAAATCACAAGAGTAGTGAG
CTCTTCTAAACGTCAGTAGTTCTTCTGCCTAAAGGATAAGGCTCTGCACT
AGGAGAAAGATGAGGCAGCCTCAGGAGGATAACCCAGAACTCAGGGATA
GGCTGGAGACTGGGGAAGTCTGCTTTGGTTTCTAATCCAGAGACTGGGT
CCAAGCCCCGCGGAGGTCATTGTGCAATAGCAGGTGTGATGGTGGTTG
GAGGGAAGTTCTAAACGGATTGTTAATCTTACTCAGACTTTTGTGGCTGA
GGATGCGTCAACATTAACTTAATTAATACTTACGAGAATAGCTGTGAATGA
GACCGGCGCTGGGTTGCAGAGCAGACAGCAGACAGCGACTAAGAGGTCA
GGCAAGCTGCTCCCGCCACACCAGCGCTGTTCCCGCCCCC
TCCTCGCCCTCCCTCCGCACTGTATATCTCAACCGTGCGCCCGG
CGCCATTGGCGTTCTGACGATGCGCTTCTCTATAAGAGGCGTCAGCTC
CCATCTCAAGTGACTCTTAACTCCAGTGGCTCTGAGGTGAGTGGTGA
GTGGGATAGCCCTCCCTGGGACATCGGATCAGAAGACTCCAGCAAGGA
CGGGATCAACTCTAGTAGGAACAGGTGAAGTCTACCCCTCAGGGCTCT
GCTCTTCGTTCTTAGAGCTTCTTGGGGGATAGCAGACCTATTCTTGAGG
ACCTCTGTGTGCCAGGAGCAGACTCTGTCCACGTTGGATTTCGGCTTAT
TGGGAACCTGTGCTCTGTGACTTCTTGCCAGCAAGAACATATTAATCTT
TTTCTT

GATA1 **STAT5** **ZBP89**

Supplementary Figure 1 (related to main Figure 1)

In silico analysis of the *Tph1* gene promoter

(A) GATA1, STAT5 and ZBP89 binding sites in the *Tph1* promoter.



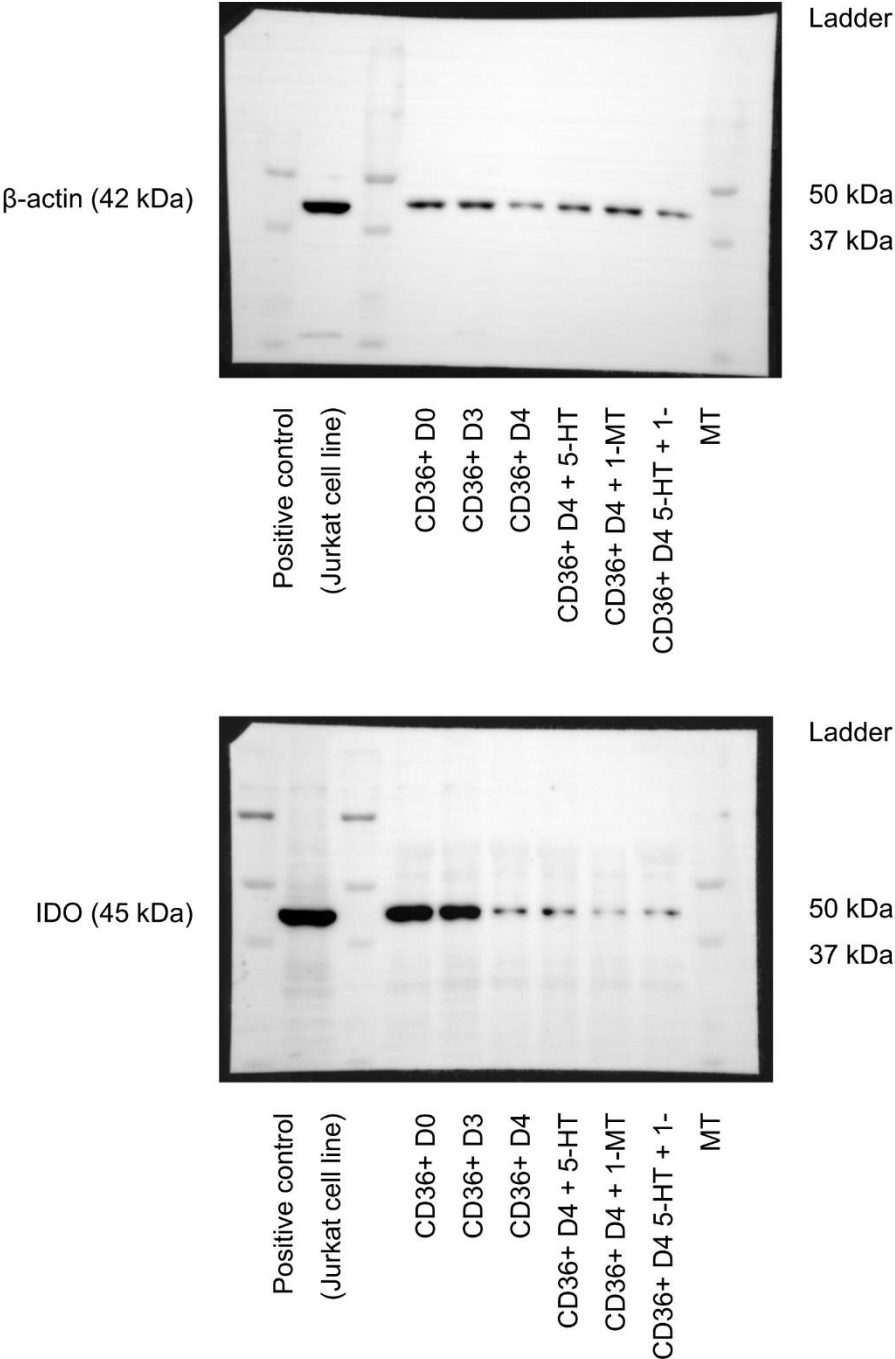
Supplementary Figure 2 (related to main Figure 6)

Impaired erythroid maturation in fetal liver of $Tph1^{-/-}$ embryos

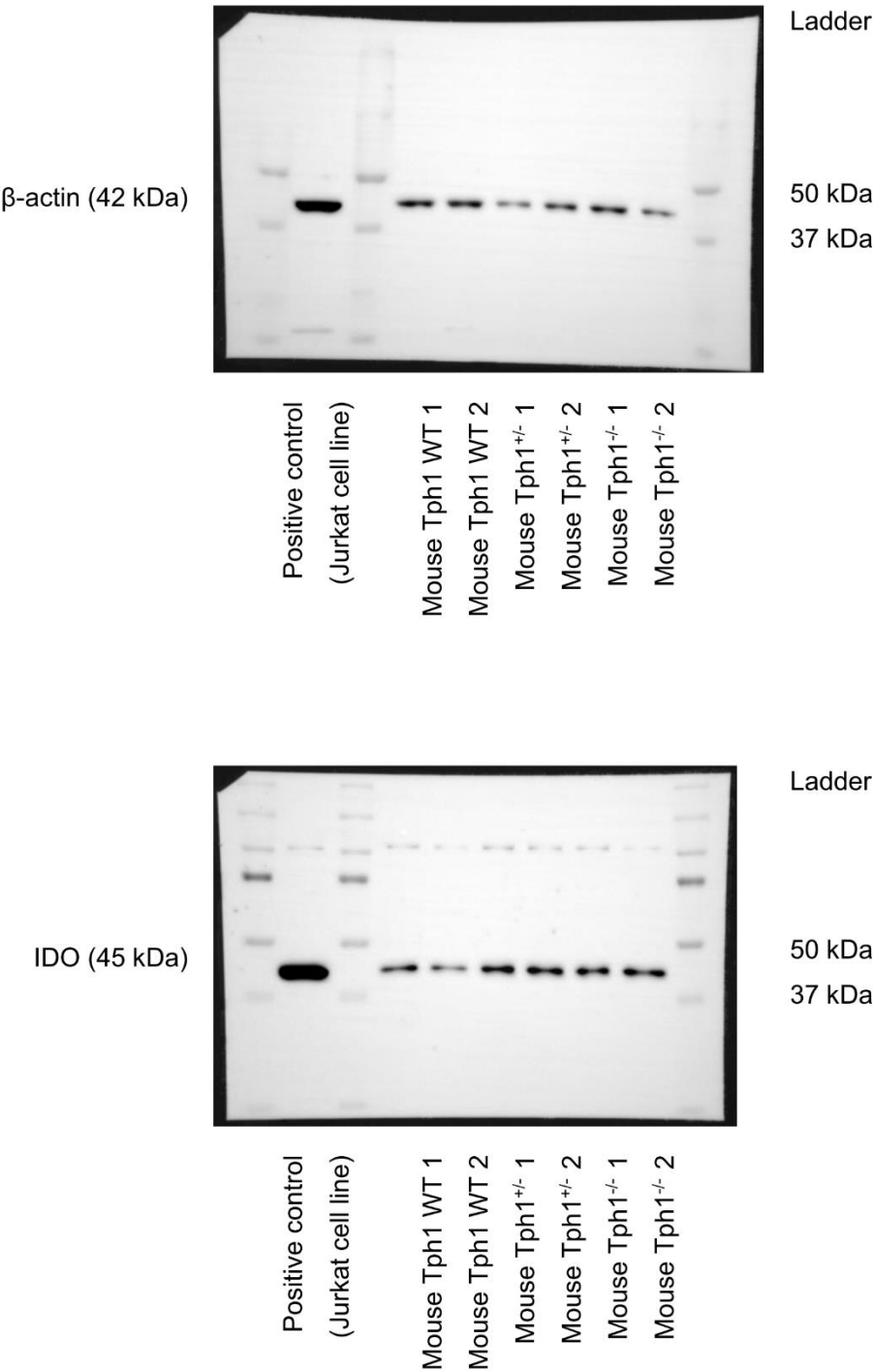
(A) Experimental procedure for FACS analysis of cells from WT and $Tph1^{-/-}$ fetal livers, as defined in Socolovsky et al., 2007 and Zhang *et al.*, 2003. (B) Total cell counts in fetal livers from $Tph1^{-/-}$ (n=13) and WT embryos (n=19) (Data are from 3 independent experiments). (C) Representative image of a FACS profiles of erythroblast cells in WT and $Tph1^{-/-}$ fetal livers at E13.5. (D) Graphs of data of erythroblast differentiation profiles from WT (n=9) and $Tph1^{-/-}$ fetal livers (n=9). Throughout data are mean $\pm$ SEM. Paired and an unpaired t-tests were used when appropriate. *P < 0.05, **P < 0.005, ***P < 0.0005.

Supplemental Data 1 and 2

Supplemental Data 1 (related to main Figure 2G). Western blot analysis of the protein IDO showed high expression from day 1 to day 3 of culture after CD36⁺ isolation (Data are from one experiment).



Supplemental Data 2 (related to main Figure 5F). Western blot analysis showing no increased in IDO expression in pro-erythroblasts derived from *Tph1*^{-/-} mice in relation with actin loading control (Data are from one experiment, n=2 WT, n=2 *Tph1*^{-/-}).



Contexte du travail

Dans la suite du travail mené par Francine Côté sur sérotonine et érythropoïèse, ayant démontré d'une part l'existence d'un système sérotoninergique complet dans la moelle osseuse, et d'autre part une action de la sérotonine sur les progéniteurs érythroïdes, nous nous sommes interrogées sur l'action possible de la sérotonine sur les cellules souches et progéniteurs en général, et dans l'hématopoïèse en particulier.

J'ai donc rédigé cette revue avec Francine Côté et Tereza Coman pour faire un état des lieux des connaissances actuelles sur le rôle de la sérotonine périphérique sur les cellules souches et progéniteurs, et pour discuter de façon plus ciblée son rôle dans l'hématopoïèse normale et pathologique.

Principaux résultats

Après un rappel sur le métabolisme de la sérotonine, nous avons discuté des modes de synthèse de la sérotonine à l'état physiologique ainsi que dans certaines situations pathologiques telles que l'hypoxie ou les lésions tissulaires.

Nous avons ensuite présenté plusieurs études démontrant un rôle de la sérotonine dans l'embryogenèse et sur les cellules souches de plusieurs organes, puis les données de la littérature sur le rôle de la sérotonine dans l'hématopoïèse, sur les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques.

Enfin, nous avons discuté du rôle possible de la sérotonine dans certaines situations pathologiques en hématologie, et de l'intérêt potentiel de cibler le système sérotoninergique dans ces situations.

Dans l'ensemble, le système sérotoninergique périphérique pourrait être une cible thérapeutique prometteuse, permettant de réguler la régénération et la mobilisation des cellules souches et progéniteurs après divers types de lésions.



Review

Serotonin, hematopoiesis and stem cells

Guillemette Fouquet^a, Tereza Coman^{a,b}, Olivier Hermine^{a,c}, Francine Côté^{a,*}^a Institut Imagine, INSERM U1163 - CNRS ERL8254, Paris, France^b Département d'hématologie, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France^c Service d'hématologie adultes, Hôpital Necker, Paris, France

ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:

5-Hydroxytryptophan (PubChem CID: 144)

Fluoxetine (PubChem CID: 3386)

Kynurenine (PubChem CID: 846)

Serotonin (PubChem CID: 5202)

Tryptophan (PubChem CID: 6305)

Keywords:

Serotonin

Tryptophan

Tph1

Hematopoiesis

Stem cell

SSRI

ABSTRACT

A large number of studies have focused on the role of serotonin as a neurotransmitter in the central nervous system, although only a small percentage of the body's serotonin (~5%) can be found in the mature brain of mammals. In the gut, the enterochromaffin cells are scattered in the enteric epithelium from the stomach through the colon and produce over 95% of the body's serotonin. Since the generation of tryptophan hydroxylase (Tph1 and Tph2) knockout mice, unsuspected roles have been identified for serotonin synthesized outside the brain. Moreover, the murine model deficient in peripheral serotonin (Tph1^{-/-}) is a unique experimental tool for exploring the molecular and cellular mechanisms involving serotonin's local effects through microserotonergic systems. In this review, we focus on peripheral serotonin and its role on progenitor or stem cells as well as on hematopoietic progenitors. We discuss the possible role of serotonin in hematopoietic diseases, and whether targeting the serotonergic system could be of therapeutic value for the regulation of normal and pathological hematopoiesis.

1. Introduction

Serotonin (5-hydroxytryptamine or 5-HT) is a monoamine highly conserved throughout evolution. It is derived from the essential amino acid tryptophan, obtained from dietary sources. As a well-known neurotransmitter in the central nervous system (CNS), 5-HT is involved in cognition, attention, emotion, pain, sleep, and arousal, to name a few examples. Yet only a small percentage of the body's 5-HT (~5%) can be found in the mature brain of mammals: most (~95%) is found synthesized in the gastrointestinal tract [1–3]. The cellular effects of 5-HT are exerted through activation of any of 15 different receptors in 7 different classes (5-HT₁ to 5-HT₇) [4]. Through these receptors, 5-HT can produce opposing effects that add to the complexity of the serotonergic system. The activity of 5-HT also depends on its extracellular availability, which is partly modulated by the specific membrane 5-HT transporter (SERT). SERT removes secreted 5-HT from the extracellular medium when it is no longer required. Treatments with selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) such as fluoxetine, by blocking the

action of SERT, lead to increased 5-HT extracellular concentrations and signaling [5]. The rate-limiting enzyme tryptophan hydroxylase (TPH) that catalyzes conversion of tryptophan into 5-hydroxytryptophan (5-HTP), the immediate precursor of 5-HT, is found only in 5-HT-producing cells [6–8].

In 2003, the generation of TPH knockout (KO) mice revealed the existence of two isoforms of the enzyme derived from two different genes with a high degree of homology in their amino acid sequences. Since then, it has been shown that peripheral or nonneuronal 5-HT is mainly—but not only, as we shall see—synthesized by the Tph1 isoform in enterochromaffin cells of the gastrointestinal tract, whereas Tph2 participates in neuronal 5-HT synthesis. Because 5-HT does not cross the blood-brain barrier, it is believed that each pool has a discrete set of functions [6,7].

An important key to the understanding of 5-HT functions and advances in our knowledge was the generation of the Tph1 and Tph2 KO murine models. For the last 15 years, the mouse model selectively deficient in peripheral 5-HT (Tph1^{-/-} or Tph1 KO), but having normal

Abbreviations: 5-HT₁ to 5-HT₇, names of 7 classes of serotonin receptors; 5-HT_{2A}R, 5-HT_{2B}R, 5-HT_{2C}R, specific serotonin receptors; 5-HTP, 5-hydroxytryptophan; AGM, aorta-gonad-mesonephros; BFU-E and CFU-E, Burst-forming Unit Erythroid and Colony forming Unit Erythroid; CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-M, Colony-Forming Unit-Granulocyte, Erythrocyte, Monocyte /Macrophage, Megakaryocyte; En, embryonic day n; HSC, hematopoietic stem cell; HSPC, hematopoietic stem / progenitor cell; KO, knockout; MDS, myelodysplastic syndrome; SERT, serotonin transporter; SSRI, selective serotonin reuptake inhibitor; TPH, tryptophan hydroxylase; Tph1 and Tph2, isoforms of tryptophan hydroxylase; Tph1^{-/-} or Tph1 KO, murine model deficient in peripheral serotonin

* Corresponding author at: Institut Imagine, INSERM U1163 – CNRS ERL8254, 24, Boulevard Montparnasse, 75015, Paris, France.

E-mail address: francine.cote@parisdescartes.fr (F. Côté).

<https://doi.org/10.1016/j.yphrs.2018.08.005>

Received 6 April 2018; Received in revised form 27 July 2018; Accepted 8 August 2018

Available online 11 August 2018

1043-6618/ © 2018 Published by Elsevier Ltd.

brain 5-HT levels, has led to the discovery of complete serotonergic systems in unexpected locations and the identification of unforeseen roles of 5-HT, from early development to adult life [6,7,9–15].

This review will focus on peripheral 5-HT, discussing 5-HT synthesis under physiological and pathological states, its role on stem and progenitor cells during development and after, and more specifically its role on hematopoiesis. We will discuss whether modulating 5-HT synthesis and signaling could be a novel tool for the regulation of normal and pathological hematopoiesis.

2. 5-HT synthesis under normal and pathological states

2.1. 5-HT synthesis

Enterochromaffin cells are scattered throughout the enteric epithelium and, as previously mentioned, produce over 95% of the body's 5-HT. Although earlier studies suggested that enterochromaffin cell activation promotes the release of 5-HT, thereby stimulating gut contractility, *Tph1*^{−/−} mice do not experience much difference in gut contractility [16]. In fact, removal of the mucosa from the colon and hence all release of 5-HT from enterochromaffin cells does not block peristalsis or other major neurogenic motor patterns in the colon [17,18]. This proves that *Tph1* dependent 5-HT synthesis and release from the mucosa is not required for the generation of peristalsis. This leaves fundamental unanswered questions about the role played by the prodigious quantities of 5-HT synthesized in enterochromaffin cells. Once synthesized and released by these cells, 5-HT is secreted into the bloodstream, where it is taken up by and accumulates in platelet-dense granules. These granules constitute the main 5-HT reservoir in the organism. As such, 5-HT can be considered a pleiotropic hormone. Although blood platelets contain a large amount of 5-HT, they do not have the ability to synthesize it. Several studies have demonstrated that 5-HT is released by circulating platelets in response to signals including contact with damaged endothelium or ischemia [19]. Others have suggested that enterochromaffin cells are used to detect luminal stimuli and couple this to the release of 5-HT [20–24].

Recently, Bellono and colleagues [25] have demonstrated that enterochromaffin cells express specific chemosensory receptors that modulate 5-HT-sensitive primary afferent nerve fibers to transduce environmental, metabolic, and homeostatic information from the gut directly to the nervous system. However, this conclusion was based on the use of a 5-HT₃ antagonist and 5-HT₃ receptors have been shown to exhibit constitutive activity [26] and potentially contribute to the excitability of neurons in the intestinal wall, even when all endogenous 5-HT has been depleted [27]. So, direct evidence that endogenous 5-HT release from enterochromaffin cells acts on any sensory nerves in the gut wall is still lacking.

Thorough analysis of the *Tph1*^{−/−} mouse model has demonstrated that 5-HT can also be released by other TPH1-expressing cells, such as pancreatic β cells [9,10], adipocytes [11], aortic smooth muscle cells [28], breast cells [12], and osteoclasts [13]. Emerging evidence emphasizes the importance of these “microserotonergic systems” (Fig. 1). Under some conditions, locally restricted 5-HT synthesis may play a predominant role [3], in contrast to the traditional view of gut derived 5-HT as a pleiotropic hormone.

2.2. 5-HT synthesis and hypoxia

It is well known that neuronal 5-HT is involved in anxiety and psychological stress control [29–31]. In light of this, it is intriguing that the importance of peripheral 5-HT has mostly been revealed under local stress conditions, for which its synthesis serves an adaptive purpose. Hence it is tempting to consider peripheral 5-HT a stress sensor or adapter.

The mucosa of the gastrointestinal tract is physiologically subject to large variation in blood perfusion and therefore partial pressure of

oxygen as a function of daily dietary intake [32]. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α) plays a central role in regulating the cellular and systemic homeostatic response to hypoxia [33]. HIF1 α isoforms are present in enterochromaffin cells [34], suggesting that hypoxia is a physiological process at baseline. In enterochromaffin cells, a hypoxia-responsive element (HRE) has been identified in the TPH1 promoter region [35,36], and 5-HT production and secretion are upregulated through a HIF1 α -sensitive mechanism [35]. On the other hand, hyperoxia induced by increasing oxygen to 100% in enterochromaffin cells inhibited HRE-mediated signaling and *Tph1* transcription, reduced 5-HT secretion, and significantly lowered HIF1 α levels [34]. Beyond physiological conditions, in mice models of intestinal ischemia, 5-HT secretion is upregulated through a HIF1 α -related mechanism associated with nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway activation [37]. Increased 5-HT secretion [38,39] and decreased levels of SERT have been observed [40], while the number of enterochromaffin cells also increases and most cells exhibit HIF1 α [41].

Neuroepithelial bodies (NEBs) in lungs are bronchopulmonary neuroendocrine cells that are the pulmonary counterparts of enterochromaffin cells. Like enterochromaffin cells, they have chemomechanical functions and serve as airway chemoreceptors [34]. When exposed to hypoxia, NEBs synthesize and release 5-HT, which activates vagal afferents and participates in the peripheral autonomous regulation of breathing [42]. In a rabbit model of lung transplantation for an ischemia-reperfusion study, high levels of 5-HT were released during the first 15 min after lung harvesting and could be antagonized by 5-HT_{2B/2C} receptor (5-HT_{2B/2C} R) antagonists [43]. It is noteworthy that *Tph1* alteration is observed as early as 15–30 min after hyper- or hypoxia, suggesting that the serotonergic system acts as a first-line adapter [34].

Altogether, 5-HT appears to be a local rapid oxygen sensor that may have broad implications in normal and pathological conditions.

2.3. 5-HT synthesis and tissue injury

Peripheral 5-HT has been involved in numerous biological processes, including vasoconstriction and vasodilatation, changes in metabolic rate, temperature control, inflammation, and fibrosis [44]. Consequently, the restorative regeneration of a functional tissue after injury, which most of these biological processes may require, has been linked to 5-HT synthesis and local secretion.

The adult mammalian liver is a highly regenerative organ that has been used to study 5-HT synthesis and action after tissue injury. In a partial hepatectomy model, peripheral 5-HT is rapidly mobilized in the remnant liver and enhances regeneration of hepatocytes via 5-HT_{2A}R signaling [14,45]. Platelet-derived 5-HT is involved in the initiation of liver regeneration through the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors on hepatocytes [46], and it plays a key role in hepatic proliferation after major tissue loss. Surprisingly, the cholangiocytes of the hepatic biliary tract have been reported to synthesize 5-HT [15] that may be a local source for hepatocyte proliferation. In addition, a complete serotonergic system has been described in sinusoidal hepatic stellate cells that express SERT and release and respond to 5-HT via autocrine and paracrine routes [47]. The available data obtained from *Tph1*^{−/−}, 5-HT_{2B}R KO, or pharmacological agonists and antagonists suggest that 5-HT/5-HT_{2A}R signaling in hepatocytes is proregenerative, whereas 5-HT_{2B}R signaling via hepatic stellate cells in a fibrogenic environment is anti-regenerative [48].

Several respiratory diseases characterized by pulmonary fibrosis have been linked to 5-HT deregulation. However, in some conditions, like acute postoperative pulmonary arterial hypertension (PAH), it has been reported that NEBs may be the major source of 5-HT [49]. Additionally, *Tph1* expression in pulmonary epithelial cells is higher in patients with idiopathic PAH, and it has been hypothesized that activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) and reactive oxygen species following 5-HT internalization promotes the

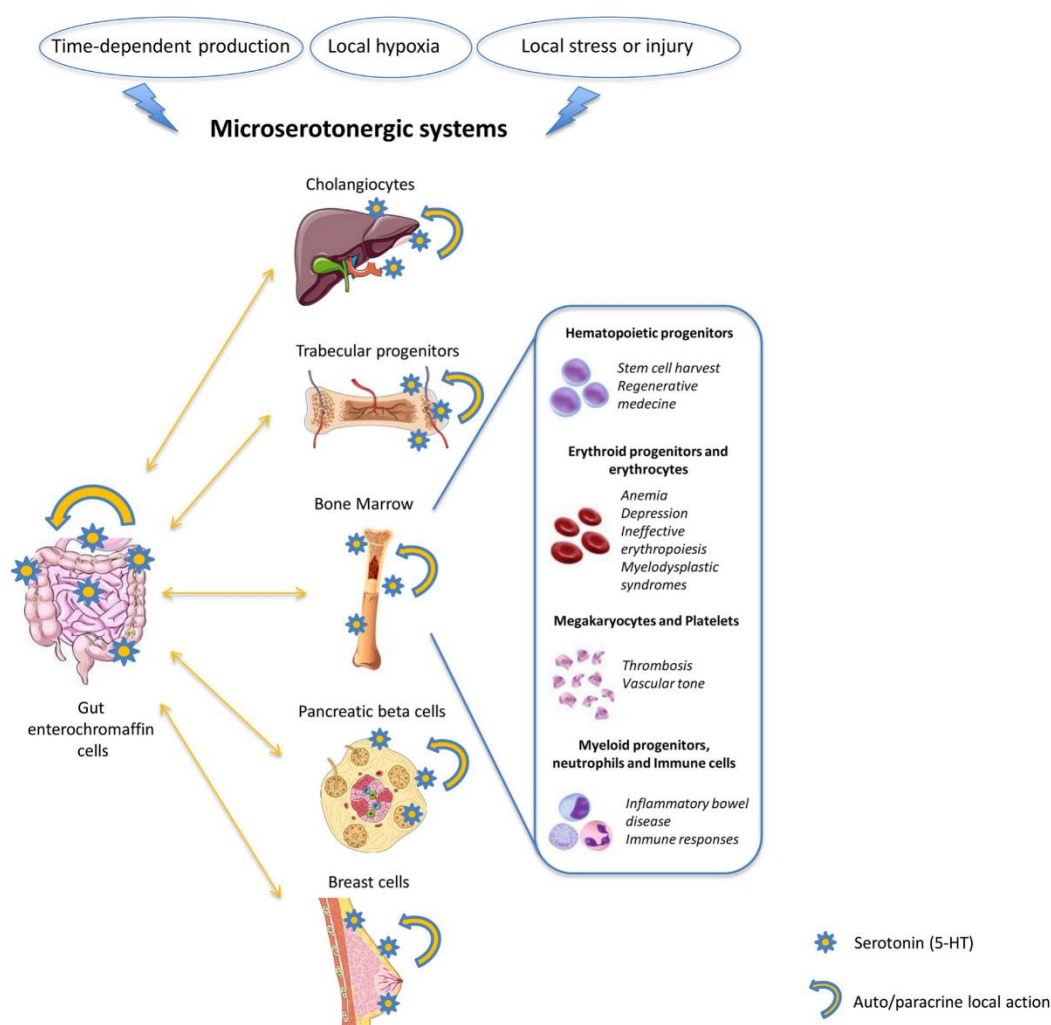


Fig. 1. Microserotonergic systems.

5-HT synthesis during a specific period may be viewed as a stress sensor or adapter to local injury. Peripheral 5-HT may be involved in the proliferation/maturation/survival of hematopoietic stem and progenitor cells through a local serotonergic system present in the bone marrow.

proliferation of arterial fibroblasts and pulmonary arterial smooth muscle cells [50,51]. Whether hypoxia or other factors—including certain drugs (e.g., methysergide, a 5-HT₁R agonist and 5-HT₂R antagonist [52], methotrexate [53] or bleomycin [54], mostly 5-HT₂R family antagonists)—are triggers of modified 5-HT signaling remains unknown. However, these reports highlight that 5-HT is particularly sensitive to local tissue injury in several models.

3. 5-HT, embryogenesis and stem cells

3.1. 5-HT and embryogenesis

In mice, once they have formed in the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region by embryonic day 10.5 (E10.5), hematopoietic stem/progenitor cells migrate to the yolk sac and later to the placenta, expanding in the fetal liver before colonizing the bone marrow prior to birth [55–57]. The placenta has been recognized as a site of hematopoiesis supporting the development of hematopoietic stem cells (HSCs)

[58,59]. But as an animal matures, bone marrow assumes the task of forming the majority of blood cells for the organism as a whole. The extrinsic and intrinsic regulatory factors controlling hematopoietic stem/progenitor cells development are still not completely understood. It is also not clear whether such factors act in a locally restricted paracrine fashion, or if stem cell production and homeostasis can be remotely modulated—for instance, hormonally. Finally, the search for novel regulators is an ongoing challenge for the development of therapeutic approaches in regenerative medicine.

Among its many roles, 5-HT is a powerful mitogen that has been shown to promote neuro- [60–62] and angiogenesis [63,64]. During embryonic development in mice, where the mitogenic action of 5-HT is particularly important, several studies have reported the presence of components of the serotonergic system [65,66], including 5-HT_{2B}R and SERT as early as E8 [7] and E9 [4]. These data indicate that 5-HT is needed by the embryo before the latter is capable of synthesizing it. It has also been shown that serotonergic drugs have the ability to interfere with development [67]. For instance, 5-HT dose-dependently stimulates

the migration of neural crest cells in culture through the 5-HT_{1A} and 5-HT_{2B} receptors in mice. In addition, 5-HT uptake inhibitors have been shown to inhibit neural crest cell migration and ectomesenchyme proliferation in complete embryos cultured *in vitro*, causing severe craniofacial malformations and suggesting that 5-HT acts as a morphogen [67].

Some reports argue for a role played by maternally derived 5-HT during development, whereas others suggest a role played by placentally derived 5-HT [66,68,69]. Recently, Laurent and colleagues used immunohistochemistry to demonstrate that villous and extravillous cytotrophoblasts, syncytiotrophoblasts, and fetal capillaries expressed TPH1 in mouse and human placenta throughout pregnancy [70]. Within an organ, the presence of 5-HT synthesis, uptake, and receptors is proposed as a complete serotonergic system. The data therefore demonstrated the presence of such a system in the placenta and *de novo* placental synthesis of 5-HT throughout pregnancy. Whether 5-HT is of maternal (paracrine) or placental (autocrine) origin during embryonic development—and whether an interaction between these two sources exists—is still a subject of debate.

3.2. 5-HT and stem cells

There are a large variety of stem cells. Having the potential to self-renew and the ability to differentiate, stem cells play essential roles at multiple stages of development. In the early embryo, pluripotent stem cells are progenitors of all tissues; whereas, later in development, tissue-restricted stem cells give rise to cells with highly specialized functions. Stem cells are the focus of fascinating investigations in science and medicine because of their potential to regenerate and repair damaged tissue [71]. And in hematology, stem cells are widely used for treatments such as bone marrow or peripheral stem cell transplantation [72]. As mentioned before, 5-HT plays a role in embryogenic development, and it also seems to have broad regenerative properties, as discussed below [46,73,74].

Matsuda et al. demonstrated that mouse mammary glands are able to synthesize 5-HT and contain a complex serotonergic regulatory system [12]. This local serotonergic system appears to play an important role in the development of mammary gland and homeostatic control of lactation.

Another cell-autonomous serotonergic system can be found in bone, where Chabbi-Achengli et al. identified 5-HT as a regulator of osteoclast differentiation and function [13]. Interestingly, they found that 5-HT was synthesized by osteoclast precursors, suggesting that 5-HT may be important not only for mature cells, but also for precursor cells.

Similarly, Ayme-Dietrich et al. established the role of 5-HT in cardiac valve remodeling through bone marrow mobilization of endothelial progenitors that express 5-HT_{2B}R, in mice and humans [75]. These cells can be recruited in the cardiac valve, where they are responsible for valve lesions. This discovery parallels findings concerning pulmonary hypertension, in which a similar mechanism involving bone marrow progenitors had previously been demonstrated [76].

In a mice model of multiple sclerosis, Ghareghani et al. found that the SSRI fluvoxamine significantly increased cell viability and proliferation of neural stem cells [77]. Physiological concentrations of fluvoxamine induced remarkably efficient differentiation of neural stem cells into oligodendrocytes, astrocytes, and neurons.

Moreover, in mouse pulp-derived stem cell lines and in a rat model of pulp injury, Baudry et al. described a major role for 5-HT in stem cell-mediated dental repair through the 5-HT₂ and 5-HT₇ receptors [78]. They demonstrated that pulp-derived stem cells were able to synthesize, catabolize, and store 5-HT, even though a bulk release of 5-HT by platelets upon pulp injury seemed essential for pulpal stem cell-based dental repair. They suggested that within the pulp, 5-HT and dopamine receptor-dependent signaling act in concert to impose stem cell quiescence and/or regulate the balance between self-renewal and differentiation. In response to pulp injury, and through a systemic 5-

HT/dopamine “damage” signal, receptor-bearing stem cells involved in dentin repair would be forced to leave their quiescent state and differentiate in order to participate in dentin repair.

4. 5-HT and hematopoiesis

4.1. 5-HT and hematopoietic stem cells

Little is known regarding the mechanism of action of 5-HT during hematopoiesis. As discussed below, it was long ago hypothesized that 5-HT had a strong erythropoietic effect in mice through stimulation of the 5-HT₂ receptor family [79,80]. Since then, several studies have considered its action on hematopoietic stem/progenitor cells. Some suggested a molecular interrelation of neuronal and hematopoietic signaling mechanisms in primary human CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells [81]. In particular, the presence of the 5-HT_{1F}R on CD34⁺ cells suggested a possible neuronal regulation of immature hematopoietic progenitors [82].

Along that line, during embryogenesis, 5-HT has been found to impact HSCs in mice [83] and zebrafish [84]. Surprisingly, in zebrafish, Kwan et al. showed that 5-HT synthesis induced by a stress signal in the brain promoted the formation of blood at a rather distant site (dorsal aorta) [84]. During early zebrafish development, hematopoietic stem/progenitor cells proliferation may be modulated by distant neurotransmitter activity, such as a hypoxic stress-induced central serotonergic neurotransmitter acting on Tph2 via the hypothalamic-pituitary-adrenal/interrenal (HPA/I) axis and local glucocorticoid–glucocorticoid receptor activity. Lv et al., using the Tph2^{−/−} mouse model, proposed that 5-HT synthesized by Tph2 in the AGM regulates hematopoietic stem/progenitor cells survival [83]. Both studies argue that a Tph2 neuronal signal was responsible for the development of hematopoietic stem/progenitor cells during early embryonic development. In contrast, Kirouac et al. reported that HSC expansion correlated with G-protein-coupled receptor neurotransmitter signaling (especially the 5-HT₂R family), giving further support to the concept of microserotonergic systems. Specifically, an endogenous serotonergic signal of nonneuronal origin produced by hematopoietic progenitor cells may be acting as an autocrine/paracrine factor to regulate the fate of hematopoietic progenitors through 5-HT receptors [85].

in vitro stimulation with 5-HT is able to induce the expansion of cultured human umbilical cord blood CD34⁺ cells, yielding early stem/progenitors (CD34⁺, CFU-GEMM) and multi-lineage-committed progenitors (BFU-E/CFU-E, CFU-GM, CFU-M) [86]. Additionally, 5-HT stimulates bone marrow stromal cell formation [86]. A few studies have further shown that neurotransmitters such as dopamine or 5-HT can improve *in vitro* proliferation and *in vivo* engraftment of hematopoietic stem/progenitor cells [85–88]. In a xenograft model, 5-HT has been shown to increase proliferation and mobility of human CD34⁺ cells derived from cord blood or circulating blood after mobilization with granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) [88], suggesting an additional role for 5-HT in HSC mobilization.

4.2. 5-HT and hematopoietic progenitors

It has been assumed for a long time that progenitors for platelets (megakaryocytes) and erythroid cells (Burst-Forming Unit and Colony Forming Unit aka BFU-E and CFU-E) differentiate from a shared precursor, namely the megakaryocyte-erythroid progenitor (MEP). Although recently immunophenotyping strategies have permitted the identification of specific intermediate progenitor populations in erythro-megakaryopoiesis (73), it is tempting to suggest that the serotonergic system may be implicated in the two lineages. In fact, the first hematopoietic cells studied in connection with the serotonergic system were megakaryocytes, due to the well-known link between 5-HT and platelets. In mice and humans [89,90], it was found that 5-HT

promoted mitogenesis in megakaryocytes through 5-HT₂ receptors and exerted an antiapoptotic effect on the megakaryocyte lineage [86]. Further studies demonstrated that 5-HT promoted megakaryopoiesis and proplatelet formation through ERK signaling and F-actin reorganization [91]. The contribution of 5-HT signaling pathways via the 5-HT_{2B}R present on hematopoietic stem cell (c-Kit+) in the bone marrow also revealed an intrinsic role on c-Kit+ progenitors in the context of hypoxia-induced vascular remodeling as observed in pulmonary hypoxia [76,92].

The hypothesis that 5-HT could play a role in erythropoiesis was proposed decades ago. In 1970, Lowly et al. demonstrated that subcutaneous administration of 5-HT in mice led to an increase in hematocrit that was erythropoietin (EPO)-dependent [79]. More recently, studies have also suggested the presence of Tph1 in erythroid progenitors, promoting their self-renewal [93–96]. Analysis of Tph1^{-/-} mice led to important findings about the role of 5-HT in erythropoiesis and red blood cell (RBC) survival [97–99]. It was demonstrated that as young adults, peripheral 5-HT-deficient mice developed macrocytic anemia due to ineffective bone marrow erythropoiesis, with hampered progression of precursors towards terminal differentiation and shortened survival of mature RBCs [99]. *in vitro* experiments with isolated Tph1^{-/-} erythroid precursors showed they have a decreased proliferative capacity that is restored by addition of 5-HT [99], suggesting they possess the capacity to synthesize 5-HT. The local production of 5-HT within bone marrow is an intense field of research. This locally produced 5-HT could act as a paracrine or autocrine agent, possibly activating the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B} receptors identified on erythroid precursors in mice [76].

5. 5-HT in hematopoietic diseases and future applications for SSRI therapy

The data discussed above suggest that 5-HT exerts a local effect through microserotonergic systems, that it has regenerative properties possibly arising from a direct role on progenitor or stem cells, and that its action on progenitor or stem cells is required mainly after an injury. As we have seen, all these findings can be applied to the hematopoietic system, in normal and pathological hematopoiesis.

The question that arises is whether the potential source of 5-HT in the bone marrow could be used as a mitogen to regulate hematopoietic stem/progenitor cells maintenance and regeneration after various types of injury. In addition, as it has been demonstrated that 5-HT plays an important role on different hematopoietic lineages, we might wonder whether SSRI treatment could have an impact on the engraftment, function, and/or mobilization of HSCs.

We will next discuss the possible role of 5-HT in hematopoietic diseases, as well as potential future applications for SSRI therapy (Fig. 2).

5.1. 5-HT and hematopoietic stem cell stimulation

Autologous or allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) are major therapies for several hematologic and some non-hematologic malignant disorders. Most autologous and nearly 3/4 of allogeneic HSCT are performed with HSC collected in the peripheral blood after mobilization. It is therefore important to properly mobilize donors, to obtain a sufficient amount of CSH for the transplant. However, up to 30% of healthy donors or patients are failing standard mobilization [100]. Interestingly, a report has suggested the involvement of dopaminergic or adrenergic neurotransmitters in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell, precisely on motility, proliferation and repopulation [88]. Indeed, norepinephrine has been shown to increase the mobilization of HSC and to induce the down-regulation of CXCL12, a chemokine essential for maintaining stem cells within the bone marrow. The use of a β -2-adrenergic agonist augmented this mobilization [88].

As discussed before, 5-HT has a role in cardiac valve remodeling through bone marrow mobilization of endothelial progenitors [75], and has been shown to increase proliferation and mobility of human CD34⁺ cells [88]. Hence SSRI treatment might have clinical applications on HSCs therapies where increase 5-HT level may help mobilization and/or engraftment of HSCs for autologous or allogeneic HSCT [85–88]. SSRI treatment could also help to improve HSC function, since some data suggest a positive impact of 5-HT on HSCs' proliferation or differentiation [86]. This beneficial effect might also be related to a positive effect of 5-HT on the bone marrow microenvironment [86]. This could be of importance in several situations leading to a differentiation blockade, such as drug-induced agranulocytosis, or in autoimmune or chemotherapy-induced bone marrow aplasia.

5.2. 5-HT, anemia and depression

Anemia is a debilitating, highly prevalent condition with heterogeneous causes and widely varying prognoses. As mentioned before, we demonstrated that erythroid precursors are sensitive to 5-HT [99]. In parallel, it is known that 5-HT affects mood, and that low levels are associated with the onset of depression. Furthermore, varying levels of its precursor, tryptophan, are likely to influence 5-HT availability. In addition, it has long been hypothesized that the kynurenine pathway of tryptophan metabolism mediates both genetic and environmental mechanisms of depression. The recent publication by Vulser and colleagues showing a robust association between depression and anemia, is of further support of the emerging link between lower 5-HT levels and anemia [101].

SSRI therapy could therefore find an application in several clinical situations where correction of anemia is challenging, or where anemia impacts the patients' quality of life. The use of SSRI with the aim of correcting both anemia and depression could be a very promising strategy.

5.3. 5-HT and myelodysplastic syndromes related anemia

Myelodysplastic syndromes (MDSs) are a heterogeneous group of clonal hematopoietic stem cell disorders characterized by dysplastic changes in the bone marrow, ineffective hematopoiesis resulting in cytopenias, and an increased risk of developing acute myeloid leukemia. MDSs are sporadic diseases affecting predominantly the elderly, with a median age of diagnosis of over 70 years, and generally having a poor prognosis.

MDSs were found to be associated with greater tryptophan breakdown and higher kynurenine levels, implying that enhanced tryptophan metabolism and elevated levels of kynurenine metabolites in patients' sera could inhibit hematopoietic progenitor amplification [102]. This enhanced breakdown of tryptophan may have an impact on hematopoiesis through a reduction in 5-HT synthesis, as it has been documented in patients with anemia of inflammation [103].

In patients with lower-risk MDSs, where anemia is a major sign, Rivero et al. observed greater overall survival among patients treated with SSRIs, including fluoxetine [104]. The authors suggest that SSRI administration could exert a cytokine regulatory effect leading to improved ineffective hematopoiesis, such that low-risk myelodysplastic patients may benefit from SSRI treatment.

5.4. 5-HT, myelodysplastic syndromes and inflammation

In MDSs, apoptosis and immune deregulation have been shown to play a role in the development of medullary hypoplasia and cytopenia. SSRI, by decreasing pro-inflammatory cytokines such as IL-6, TNF α and IFN γ , could be beneficial in several situations where inflammation is deleterious, such as MDSs but also other inflammatory diseases.

Consistently, a neuro-inflammatory response is detected in a large number of patients suffering from depression, with features including

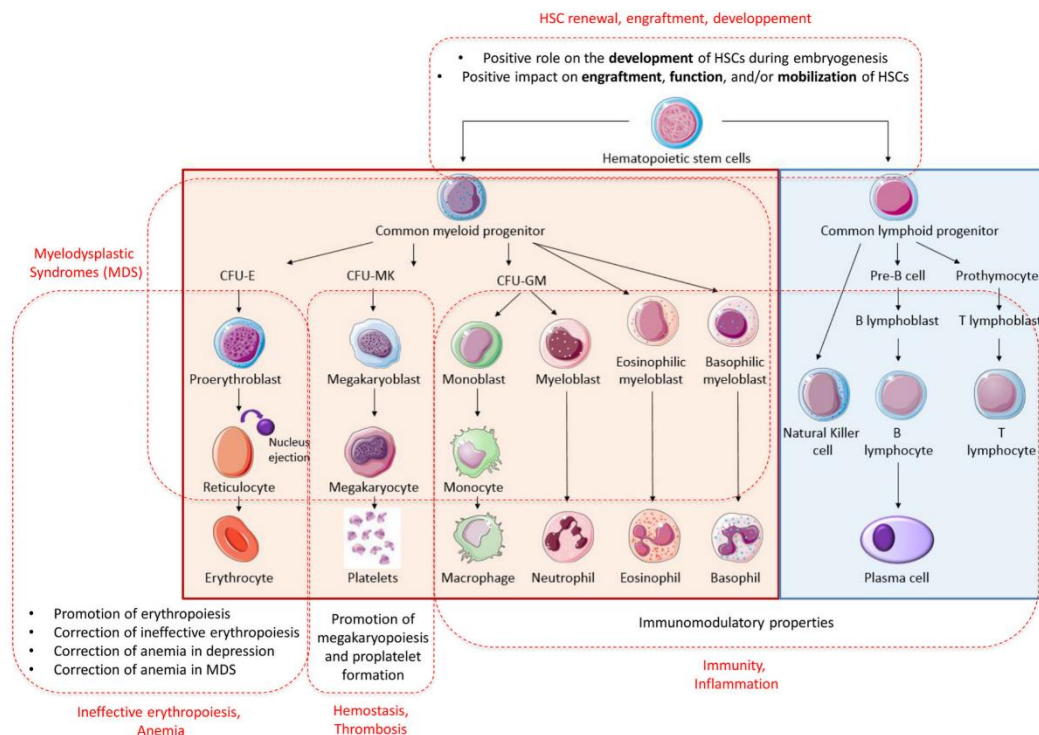


Fig. 2. General overview of hematopoiesis and potential benefits of the increase of 5-HT levels by SSRIs.

an increase of pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF α) [105,106]. This neuro-inflammatory response, along with the observation that many symptoms developed in chronic inflammation are similar to the symptoms presented by depressive patients (lack of movement, indifference, self-neglect and reduced intake of food), led to the inflammatory and neurodegeneration hypothesis of major depression [105,107]. This data supports the hypothesis that SSRIs could be of interest in various inflammatory diseases.

6. Discussion and conclusion

Animal models play a crucial role in helping us understand basic cellular biological phenomena. Since the discovery of the second Tph isoform, an important key to the understanding of 5-HT functions both in the CNS and in the periphery has been the use of KO mice models. Detailed analysis of the mouse model selectively deficient in peripheral 5-HT (Tph1^{-/-} or Tph1 KO) suggested that local physiological serotonergic networks might exist not exclusively in the gut but also in the placenta and the bone marrow, where they would be involved in hematopoietic stem/progenitor cells proliferation. However, the possibility that gut-derived 5-HT or neuronal 5-HT exerts an activity on hematopoietic stem/progenitor cells proliferation during early embryonic development is not excluded. Albeit within an organ or a specific cell type, local Tph enzymatic activity, followed by endogenous production of 5-HT and the presence of serotonergic components (receptors, SERT) are of importance and support the view that 5-HT is a monoamine with a paracrine/autocrine function. Hence, a locally derived source of 5-HT acting directly on 5-HT receptors present on HSCs does not require an intermediate signal such as the one observed in zebrafish embryos where 5-HT synthesized by Tph2 in the CNS regulates embryonic HSPC production via a glucocorticoid receptor signaling [84].

Whether peripheral 5-HT could be considered as a stress sensor or

adapter and whether targeting the serotonergic system could be of therapeutic value are questions of high interest, still some questions remain unanswered. One concern can be how to specifically increase 5-HT concentration locally, for instance in the bone marrow for the development of HSCs. Available molecules include 5-HT receptors specific agonists and antagonists, or SSRI, however whether these drugs could increase extracellular concentrations and signaling of 5-HT in the bone marrow remains unknown. Timing is also an important concern as it seems that 5-HT is critical at specific checkpoints, or after an injury. Altogether, the serotonergic system may be a promising therapeutic target with broad regenerative capacity to regulate stem cell maintenance and regeneration following various types of injury.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from Laboratory of Excellence GR-Ex, reference ANR-11-LABX-0051. The labex GR-Ex is funded by the program "Investissements d'avenir" of the French National Research Agency, reference ANR-11-IDEX-0005-02. GF, TC, OH, FC wrote the paper. The authors declare no competing interests. The authors would like to thank Jason Miller for critical reading and editing of the manuscript.

References

- [1] V. Erspamer, Experimental research on the biological significance of enterochromaffin cells, *Arch. Fisiol.* 37 (1937) 156–159.
- [2] V. Erspamer, B. Asero, Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine, *Nature* 169 (4306) (1952) 800–801.
- [3] S.N. Spohn, G.M. Mawe, Non-conventional features of peripheral serotonin signalling - the gut and beyond, *Nature reviews, Gastroenterol. Hepatol.* 14 (7) (2017) 412–420.
- [4] D. Hoyer, J.P. Hannon, G.R. Martin, Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71 (4) (2002) 533–554.

- [15] J.P. Feighner, Mechanism of action of antidepressant medications, *J. Clin. Psychiatry* 60 (Suppl 4) (1999) 4–11 discussion 12–3.
- [16] F. Cote, E. Thevenot, C. Fligny, Y. Fromes, M. Darmon, M.A. Ripoche, E. Bayard, N. Hanoun, F. Saurini, P. Lechat, L. Dandolo, M. Hamon, J. Mallet, G. Vojdani, Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (23) (2003) 13525–13530.
- [17] D.J. Walther, J.U. Peter, S. Bashammakh, H. Hortnagl, M. Voits, H. Fink, M. Bader, Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform, *Science* (New York, N.Y.) 299 (5603) (2003) 76.
- [18] L. Gutknecht, C. Kriegebaum, J. Waider, A. Schmitt, K.P. Lesch, Spatio-temporal expression of tryptophan hydroxylase isoforms in murine and human brain: convergent data from Tph2 knockout mice, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 19 (4) (2009) 266–282.
- [19] H. Kim, Y. Toyofuku, F.C. Lynn, E. Chak, T. Uchida, H. Mizukami, Y. Fujitani, R. Kawamori, T. Miyatsuka, Y. Kosaka, K. Yang, G. Honig, M. van der Hart, N. Kishimoto, J. Wang, S. Yagihashi, L.H. Tecott, H. Watada, M.S. German, Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy, *Nat. Med.* 16 (7) (2010) 804–808.
- [20] N. Paulmann, M. Grohmann, J.P. Voigt, B. Bert, J. Vowinkel, M. Bader, M. Skelin, M. Jevsek, H. Fink, M. Rupnik, D.J. Walther, Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation, *PLoS Biol.* 7 (10) (2009) e1000229.
- [21] A.K. Stunes, J.E. Reseland, O. Hauso, M. Kidd, K. Tommeras, H.L. Waldum, U. Syversen, B.I. Gustafsson, Adipocytes express a functional system for serotonin synthesis, reuptake and receptor activation, *Diabetes Obes. Metab.* 13 (6) (2011) 551–558.
- [22] M. Matsuda, T. Imaoka, A.J. Vomachka, G.A. Gudelsky, Z. Hou, M. Mistry, J.P. Bailey, K.M. Nieport, D.J. Walther, M. Bader, N.D. Horseman, Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop, *Dev. Cell* 6 (2) (2004) 193–203.
- [23] Y. Chabbi-Achengli, A.E. Coudert, J. Callebort, V. Geoffroy, F. Cote, C. Collet, M.C. de Vernejoul, Decreased osteoclastogenesis in serotonin-deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (7) (2012) 2567–2572.
- [24] A. Nocito, P. Georgiev, F. Dahm, W. Jochum, M. Bader, R. Graf, P.A. Clavien, Platelets and platelet-derived serotonin promote tissue repair after normothermic hepatic ischemia in mice, *Hepatology* (Baltimore, Md.) 45 (2) (2007) 369–376.
- [25] A. Omenetti, L. Yang, R.R. Gainetdinov, C.D. Guy, S.S. Choi, W. Chen, M.G. Caron, A.M. Diehl, Paracrine modulation of cholangiocyte serotonin synthesis orchestrates biliary remodeling in adults, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300 (2) (2011) G303–G315.
- [26] Z. Li, A. Chalazonitis, Y.Y. Huang, J.J. Mann, K.G. Margolis, Q.M. Yang, D.O. Kim, F. Cote, J. Mallet, M.D. Gershon, Essential roles of enteric neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons, *J. Neurosci.* 31 (24) (2011) 8998–9009.
- [27] D.J. Keating, N.J. Spencer, Release of 5-hydroxytryptamine from the mucosa is not required for the generation or propagation of colonic migrating motor complexes, *Gastroenterology* 138 (2) (2010) 659–70 670.e1–2.
- [28] N.J. Spencer, S.J. Nicholas, L. Robinson, M. Kyloh, N. Flack, S.J. Brookes, V.P. Zagorodnyuk, D.J. Keating, Mechanisms underlying distension-evoked peristalsis in guinea pig distal colon: is there a role for enterochromaffin cells? *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 301 (3) (2011) G519–G527.
- [29] F. Cote, C. Fligny, Y. Fromes, J. Mallet, G. Vojdani, Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function, *Trends Mol. Med.* 10 (5) (2004) 232–238.
- [30] P.P. Bertrand, R.L. Bertrand, Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract, *Autonom. Neurosci.: Basic Clin.* 153 (1–2) (2010) 47–57.
- [31] E. Bulbring, R.C. Lin, The effect of intraluminal application of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan on peristalsis; the local production of 5-HT and its release in relation to intraluminal pressure and propulsive activity, *J. Physiol.* 140 (3) (1958) 381–407.
- [32] M. Fujimiya, H. Yamamoto, A. Kuwahara, Effect of VIP and PACAP on vascular and luminal release of serotonin from isolated perfused rat duodenum, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 865 (1998) 495–502.
- [33] M. Kidd, I.M. Modlin, B.I. Gustafsson, I. Drozdov, O. Hauso, R. Pfragner, Luminal regulation of normal and neoplastic human EC cell serotonin release is mediated by bile salts, amines, tastants, and olfactants, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 295 (2) (2008) G260–G272.
- [34] K. Tsukamoto, H. Ariga, C. Mantyh, T.N. Pappas, H. Yanagi, T. Yamamura, T. Takahashi, Luminally released serotonin stimulates colonic motility and accelerates colonic transit in rats, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293 (1) (2007) R64–R69.
- [35] N.W. Bellono, J.R. Bayrer, D.B. Leitch, J. Castro, C. Zhang, T.A. O'Donnell, S.M. Brierley, H.A. Ingraham, D. Julius, Enterochromaffin cells are gut chemosensors that couple to sensory neural pathways, *Cell* 170 (1) (2017) 185–198 e16.
- [36] X.Q. Hu, R.W. Peoples, The 5-HT3B subunit confers spontaneous channel opening and altered ligand properties of the 5-HT3 receptor, *J. Biol. Chem.* 283 (11) (2008) 6826–6831.
- [37] N.J. Spencer, Constitutively active 5-HT receptors: an explanation of how 5-HT antagonists inhibit gut motility in species where 5-HT is not an enteric neurotransmitter? *Front. Cell. Neurosci.* 9 (2015) 487.
- [38] W. Ni, T.J. Geddes, J.R. Priestley, T. Szasz, D.M. Kuhn, S.W. Watts, The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries, *Br. J. Pharmacol.* 154 (3) (2008) 663–674.
- [39] M.G. Craske, M.B. Stein, Anxiety, *Lancet* 388 (10063) (2016) 3048–3059.
- [40] B. Olivier, Serotonin: a never-ending story, *Eur. J. Pharmacol.* 753 (2015) 2–18.
- [41] B.L. Jacobs, E.C. Azmitia, Structure and function of the brain serotonin system, *Physiol. Rev.* 72 (1) (1992) 165–229.
- [42] C.T. Taylor, S.P. Colgan, Hypoxia and gastrointestinal disease, *J. Mol. Med. (Berlin, Germany)* 85 (12) (2007) 1295–1300.
- [43] G.L. Semenza, Life with oxygen, *Science* (New York, N.Y.) 318 (5847) (2007) 62–64.
- [44] M. Haugen, R. Dammen, B. Svejda, B.I. Gustafsson, R. Pfragner, I. Modlin, M. Kidd, Differential signal pathway activation and 5-HT function: the role of gut enterochromaffin cells as oxygen sensors, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 303 (10) (2012) G1164–G1173.
- [45] R. Pocock, O. Hobert, Hypoxia activates a latent circuit for processing gustatory information in *C. elegans*, *Nat. Neurosci.* 13 (5) (2010) 610–614.
- [46] M.S. Rahman, P. Thomas, Molecular cloning, characterization and expression of two tryptophan hydroxylase (TPH-1 and TPH-2) genes in the hypothalamus of Atlantic croaker: down-regulation after chronic exposure to hypoxia, *Neuroscience* 158 (2) (2009) 751–765.
- [47] M. Brønstad, R. Pfragner, B. Gustafsson, M. Kidd, E. Solligard, Hypoxia and gut neuroendocrine cells: the role of HIF-1α, NfκB and serotonin production from enterochromaffin cells in intestinal ischemia, *Gastroenterology* 140 (S698) (2011) Mo2010.
- [48] A.E. Bishop, R. Pietroletti, C.W. Taat, W.H. Brummelkamp, J.M. Polak, Increased populations of endocrine cells in Crohn's ileitis, *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 410 (5) (1987) 391–396.
- [49] M. El-Salhy, A. Danielsson, R. Stenling, L. Grmelius, Colonic endocrine cells in inflammatory bowel disease, *J. Intern. Med.* 242 (5) (1997) 413–419.
- [50] M.D. Coates, C.R. Mahoney, D.R. Linden, J.E. Sampson, J. Chen, H. Blaszyk, M.D. Crowell, K.A. Sharkey, M.D. Gershon, G.M. Mawe, P.L. Moses, Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome, *Gastroenterology* 126 (7) (2004) 1657–1664.
- [51] K. Kyosola, O. Penttilä, M. Salaspuro, Rectal mucosal adrenergic innervation and enterochromaffin cells in ulcerative colitis and irritable colon, *Scand. J. Gastroenterol.* 12 (3) (1977) 363–367.
- [52] E. Cutz, H. Yeger, J. Pan, Pulmonary neuroendocrine cell system in pediatric lung disease—recent advances, *Pediatr. Dev. Pathol.* 10 (6) (2007) 419–435.
- [53] J.L. Arreola-Ramirez, J. Alquicira-Mireles, P.E. Morales-Hernandez, M.H. Vargas, J. Villalba-Caloca, P. Segura-Medina, 5-HT receptor antagonism attenuates the ischemia-reperfusion injury after rabbit lung preservation, *Transplant. Proc.* 47 (6) (2015) 1653–1656.
- [54] M. Berger, J.A. Gray, B.L. Roth, The expanded biology of serotonin, *Annu. Rev. Med.* 60 (2009) 355–366.
- [55] H.O. Yokoyama, M.E. Wilson, K.K. Tsuboi, R.E. Stowell, Regeneration of mouse liver after partial hepatectomy, *Cancer Res.* 13 (1) (1953) 80–85.
- [56] M. Lesurtel, R. Graf, B. Aleil, D.J. Walther, Y. Tian, W. Jochum, C. Gachet, M. Bader, P.A. Clavien, Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration, *Science* (New York, N.Y.) 312 (5770) (2006) 104–107.
- [57] R.G. Ruddell, F. Oakley, Z. Hussain, I. Yeung, L.J. Bryan-Lluka, G.A. Ramm, D.A. Mann, A role for serotonin (5-HT) in hepatic stellate cell function and liver fibrosis, *Am. J. Pathol.* 169 (3) (2006) 861–876.
- [58] M.R. Ebrahimi, F. Oakley, L.B. Murphy, J. Mann, A. Moles, M.J. Perugorria, E. Ellis, A.F. Lakey, A.D. Burt, A. Douglass, M.C. Wright, S.A. White, F. Jaffre, L. Maroteaux, D.A. Mann, Stimulating healthy tissue regeneration by targeting the 5-HT(2B) receptor in chronic liver disease, *Nat. Med.* 17 (12) (2011) 1668–1673.
- [59] D.E. Johnson, M.K. Georgieff, Pulmonary neuroendocrine cells. Their secretory products and their potential roles in health and chronic lung disease in infancy, *Am. Rev. Respir. Dis.* 140 (6) (1989) 1807–1812.
- [60] M.R. Maclean, Y. Dempsey, The serotonin hypothesis of pulmonary hypertension revisited, *Adv. Exp. Med. Biol.* 661 (2010) 309–322.
- [61] J.M. Launay, P. Herve, K. Peoc'h, C. Tournois, J. Callebort, C.G. Nebigil, N. Etienne, L. Drouet, M. Humbert, G. Simonneau, L. Maroteaux, Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension, *Nat. Med.* 8 (10) (2002) 1129–1135.
- [62] M.B. Ramirez Rosas, S. Labrujere, C.M. Villalon, A. Maassen Vandenbrink, Activation of 5-hydroxytryptamine1B/1D/1F receptors as a mechanism of action of antimigraine drugs, *Expert Opin. Pharmacother.* 14 (12) (2013) 1599–1610.
- [63] Y. Takano, T. Machida, Y. Obara, M. Hirano, S. Kudo, M. Takagi, N. Hamaue, K. Iizuka, M. Hirafuji, Methotrexate causes a change in intestinal 5-hydroxytryptamine metabolism in rats, *Eur. J. Pharmacol.* 740 (2014) 496–503.
- [64] A. Fabre, J. Marchal-Somme, S. Marchand-Adam, C. Quesnel, R. Borie, M. Dehoux, C. Ruffie, J. Callebort, J.M. Launay, D. Henin, P. Soler, B. Crestani, Modulation of bleomycin-induced lung fibrosis by serotonin receptor antagonists in mice, *Eur. Respir. J.* 32 (2) (2008) 426–436.
- [65] E. Dzierzak, C. Robin, Placenta as a source of hematopoietic stem cells, *Trends Mol. Med.* 16 (8) (2010) 361–367.
- [66] S. Taoudi, A. Medvinsky, Functional identification of the hematopoietic stem cell niche in the ventral domain of the embryonic dorsal aorta, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (22) (2007) 9399–9403.
- [67] H.K. Mikkola, S.H. Orkin, The journey of developing hematopoietic stem cells, *Development* (Cambridge, England) 133 (19) (2006) 3733–3744.
- [68] L.K. Lee, M. Ueno, B. Van Handel, H.K. Mikkola, Placenta as a newly identified source of hematopoietic stem cells, *Curr. Opin. Hematol.* 17 (4) (2010) 313–318.
- [69] C. Gekas, F. Dieterlen-Lievre, S.H. Orkin, H.K. Mikkola, The placenta is a niche for hematopoietic stem cells, *Dev. Cell* 8 (3) (2005) 365–375.
- [70] T. Vitalis, J.G. Parnavelas, The role of serotonin in early cortical development, *Dev. Neurosci.* 25 (2–4) (2003) 245–256.
- [71] E. Deneris, P. Gaspar, Serotonin neuron development: shaping molecular and

- structural identities, Wiley interdisciplinary reviews, *Dev. Biol.* 7 (1) (2018).
- [62] M. Khodanovich, A. Kisel, M. Kudabaeva, G. Chernysheva, V. Smolyakova, E. Krutenkova, I. Wasserlauf, M. Plotnikov, V. Yarnykh, Effects of fluoxetine on hippocampal neurogenesis and neuroprotection in the model of global cerebral ischemia in rats, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (1) (2018).
 - [63] G.M. Nemecek, S.R. Coughlin, D.A. Handley, M.A. Moskowitz, Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83 (3) (1986) 674–678.
 - [64] A. Zamani, Z. Qu, Serotonin activates angiogenic phosphorylation signaling in human endothelial cells, *FEBS Lett.* 586 (16) (2012) 2360–2365.
 - [65] D.L. Shuey, T.W. Sadler, H. Tamir, J.M. Lauder, Serotonin and morphogenesis. Transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse, *Anat. Embryol.* 187 (1) (1993) 75–85.
 - [66] F. Cote, C. Fligny, E. Bayard, J.M. Launay, M.D. Gershon, J. Mallet, G. Vojdani, Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (1) (2007) 329–334.
 - [67] D.L. Shuey, T.W. Sadler, J.M. Lauder, Serotonin as a regulator of craniofacial morphogenesis: site specific malformations following exposure to serotonin uptake inhibitors, *Teratology* 46 (4) (1992) 367–378.
 - [68] A. Bonnin, N. Goeden, K. Chen, M.L. Wilson, J. King, J.C. Shih, R.D. Blakely, E.S. Deneris, P. Levitt, A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain, *Nature* 472 (7343) (2011) 347–350.
 - [69] H.J. Kliman, S.B. Quaratella, A.C. Setaro, E.C. Siegman, Z.T. Subha, R. Tal, K.M. Milano, T.L. Steck, Pathway of maternal serotonin to the human embryo and fetus, *Endocrinology* 159 (4) (2018) 1609–1629.
 - [70] L. Laurent, K. Deroy, J. St-Pierre, F. Cote, J.T. Sanderson, C. Vaillancourt, Human placenta expresses both peripheral and neuronal isoform of tryptophan hydroxylase, *Biochimie* 140 (2017) 159–165.
 - [71] R.S. Mahla, Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics, *Int. J. Cell Biol.* 2016 (2016) 6940283.
 - [72] A. Gratwohl, H. Baldomero, J. Passweg, Hematopoietic stem cell transplantation activity in Europe, *Curr. Opin. Hematol.* 20 (6) (2013) 485–493.
 - [73] K. Seuwen, J. Pouyssegur, Serotonin as a growth factor, *Biochem. Pharmacol.* 39 (6) (1990) 985–990.
 - [74] B.L. Famburg, S.L. Lee, A new role for an old molecule: serotonin as a mitogen, *Am. J. Physiol.* 272 (5 Pt 1) (1997) L795–806.
 - [75] E. Ayme-Dietrich, R. Lawson, F. Cote, C. de Tapia, S. Da Silva, C. Ebel, B. Hechler, C. Gachet, J. Guyonnet, H. Rouillard, J. Stoltz, E. Quentin, S. Banas, F. Daubeuf, N. Frossard, B. Gasser, J.P. Mazzucotelli, O. Hermine, L. Maroteaux, L. Monassier, The role of 5-HT2B receptors in mitral valvulopathy: bone marrow mobilization of endothelial progenitors, *Br. J. Pharmacol.* 174 (22) (2017) 4123–4139.
 - [76] J.M. Launay, P. Herve, J. Callebort, Z. Mallat, C. Collet, S. Doly, A. Belmer, S.L. Diaz, S. Hatia, F. Cote, M. Humbert, L. Maroteaux, Serotonin 5-HT2B receptors are required for bone-marrow contribution to pulmonary arterial hypertension, *Blood* 119 (7) (2012) 1772–1780.
 - [77] M. Ghareghani, K. Zibara, H. Sadeghi, S. Dokoochaki, H. Sadeghi, R. Aryanpour, A. Ghanbari, Fluvoxamine stimulates oligodendrogenesis of cultured neural stem cells and attenuates inflammation and demyelination in an animal model of multiple sclerosis, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 4923.
 - [78] A. Baudry, A. Alleaume-Butaux, S. Dimitrova-Nakov, M. Goldberg, B. Schneider, J.M. Launay, O. Kellermann, Essential roles of dopamine and serotonin in tooth repair: functional interplay between odontogenic stem cells and platelets, *Stem Cells* (Dayton, Ohio) 33 (8) (2015) 2586–2595.
 - [79] P.H. Lowy, G. Keighley, N.S. Cohen, Stimulation by serotonin of erythropoietin-dependent erythropoiesis in mice, *Br. J. Haematol.* 19 (6) (1970) 711–718.
 - [80] R.J. Noveck, J.W. Fisher, Erythropoietic effects of 5-hydroxytryptamine, proceedings of the society for experimental biology and medicine, *Soc. Exp. Biol. Med. (New York, N.Y.)* 138 (1) (1971) 103–107.
 - [81] U. Steidl, S. Bork, S. Schaub, O. Selbach, J. Seres, M. Aivado, T. Schroeder, U.P. Rohr, R. Fenk, S. Kliszewski, C. Maercker, P. Neubert, S.R. Bornstein, H.L. Haas, G. Kobbe, D.G. Tenen, R. Haas, R. Kronenwett, Primary human CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells express functionally active receptors of neuromodulators, *Blood* 104 (1) (2004) 81–88.
 - [82] E.G. Skurikhin, A.M. Dygai, N.I. Suslov, N.V. Provalova, G.N. Zyuz'kov, E.D. Gol'dberg, Role of the central nervous system in hemopoiesis regulation during experimental neuroses, *Bull. Exp. Biol. Med.* 131 (1) (2001) 33–37.
 - [83] J. Lv, L. Wang, Y. Gao, Y.Q. Ding, F. Liu, 5-hydroxytryptamine synthesized in the aorta-gonad-mesonephros regulates hematopoietic stem and progenitor cell survival, *J. Exp. Med.* 214 (2) (2017) 529–545.
 - [84] W. Kwan, M. Cortes, I. Frost, V. Esain, L.N. Theodore, S.Y. Liu, N. Budrow, W. Goessling, T.E. North, The central nervous system regulates embryonic HSPC production via stress-responsive glucocorticoid receptor signaling, *Cell Stem Cell* 19 (3) (2016) 370–382.
 - [85] D.C. Kirouac, C. Ito, E. Csaszar, A. Roch, M. Yu, E.A. Sykes, G.D. Bader, P.W. Zandstra, Dynamic interaction networks in a hierarchically organized tissue, *Mol. Syst. Biol.* 6 (2010) 417.
 - [86] M. Yang, K. Li, P.C. Ng, C.K. Chuen, T.K. Lau, Y.S. Cheng, Y.S. Liu, C.K. Li, P.M. Yuen, A.E. James, S.M. Lee, T.F. Fok, Promoting effects of serotonin on hematopoiesis: ex vivo expansion of cord blood CD34+ stem/progenitor cells, proliferation of bone marrow stromal cells, and antiapoptosis, *Stem Cells* (Dayton, Ohio) 25 (7) (2007) 1800–1806.
 - [87] A. Spiegel, A. Kalinkovich, S. Shvitiel, O. Kollet, T. Lapidot, Stem cell regulation via dynamic interactions of the nervous and immune systems with the micro-environment, *Cell Stem Cell* 3 (5) (2008) 484–492.
 - [88] A. Spiegel, S. Shvitiel, A. Kalinkovich, A. Ludin, N. Netzer, P. Goichberg, Y. Azaria, I. Resnick, I. Hardan, H. Ben-Hur, A. Nagler, M. Rubinstein, T. Lapidot, Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34+ cells through Wnt signaling, *Nat. Immunol.* 8 (10) (2007) 1123–1131.
 - [89] M. Yang, A. Srikiatkachorn, M. Anthony, B.H. Chong, Serotonin stimulates megakaryocytopoiesis via the 5-HT2 receptor, *Blood Coagul. Fibrinolysis* 7 (2) (1996) 127–133.
 - [90] M. Yang, A. Srikiatkachorn, M. Anthony, C.N. Chesterman, B.H. Chong, Serotonin uptake, storage and metabolism in megakaryoblasts, *Int. J. Hematol.* 63 (2) (1996) 137–142.
 - [91] J.Y. Ye, E.Y. Liang, Y.S. Cheng, G.C. Chan, Y. Ding, F. Meng, M.H. Ng, B.H. Chong, Q. Lian, M. Yang, Serotonin enhances megakaryopoiesis and proplatelet formation via p-Erk1/2 and F-actin reorganization, *Stem Cells* (Dayton, Ohio) 32 (11) (2014) 2973–2982.
 - [92] N. Gambaryan, F. Perros, D. Montani, S. Cohen-Kaminsky, M. Mazmanian, J.F. Renaud, G. Simonneau, A. Lombet, M. Humbert, Targeting of c-kit+ haematopoietic progenitor cells prevents hypoxic pulmonary hypertension, *Eur. Respir. J.* 37 (6) (2011) 1392–1399.
 - [93] L. Zhang, L. Prak, V. Rayon-Estrada, P. Thiru, J. Flygare, B. Lim, H.F. Lodish, ZFP36L2 is required for self-renewal of early burst-forming unit erythroid progenitors, *Nature* 499 (7456) (2013) 92–96.
 - [94] A. Kolbus, M. Blazquez-Domingo, S. Carotta, W. Bakker, S. Luedemann, M. von Lindern, P. Steinlein, H. Beug, Cooperative signaling between cytokine receptors and the glucocorticoid receptor in the expansion of erythroid progenitors: molecular analysis by expression profiling, *Blood* 102 (9) (2003) 3136–3146.
 - [95] H.Y. Lee, X. Gao, M.I. Barrasa, H. Li, R.R. Elmes, L.L. Peters, H.F. Lodish, PPAR- α and glucocorticoid receptor synergize to promote erythroid progenitor self-renewal, *Nature* 522 (7557) (2015) 474–477.
 - [96] J. Flygare, V. Rayon Estrada, C. Shin, S. Gupta, H.F. Lodish, HIF1 α synergizes with glucocorticoids to promote BFU-E progenitor self-renewal, *Blood* 117 (12) (2011) 3435–3444.
 - [97] P. Amireault, E. Bayard, J.M. Launay, D. Sibon, C. Le Van Kim, Y. Colin, M. Dy, O. Hermine, F. Cote, Serotonin is a key factor for mouse red blood cell survival, *PLoS One* 8 (12) (2013) e83010.
 - [98] P. Amireault, D. Sibon, F. Cote, Life without peripheral serotonin: insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks, *ACS Chem. Neurosci.* 4 (1) (2013) 64–71.
 - [99] P. Amireault, S. Hatia, E. Bayard, F. Bernex, C. Collet, J. Callebort, J.M. Launay, O. Hermine, E. Schneider, J. Mallet, M. Dy, F. Cote, Ineffective erythropoiesis with reduced red blood cell survival in serotonin-deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (32) (2011) 13141–13146.
 - [100] L.B. To, J.P. Levesque, K.E. Herbert, How I treat patients who mobilize hematopoietic stem cells poorly, *Blood* 118 (17) (2011) 4530–4540.
 - [101] H. Vulser, E. Wiernik, N. Hoertel, F. Thomas, B. Pannier, S. Czernichow, O. Hanon, T. Simon, J.M. Simon, N. Danchin, F. Limosin, C. Lemogne, Association between depression and anemia in otherwise healthy adults, *Acta Psychiatr. Scand.* 134 (2) (2016) 150–160.
 - [102] C. Berthon, M. Fontenay, S. Corm, I. Briche, D. Allorge, B. Hennart, M. Lhermitte, B. Quesnel, Metabolites of tryptophan catabolism are elevated in sera of patients with myelodysplastic syndromes and inhibit hematopoietic progenitor amplification, *Leuk. Res.* 37 (5) (2013) 573–579.
 - [103] G. Weiss, K. Schroeksnadel, V. Mattle, C. Winkler, G. Konwalinka, D. Fuchs, Possible role of cytokine-induced tryptophan degradation in anaemia of inflammation, *Eur. J. Haematol.* 72 (2) (2004) 130–134.
 - [104] A. Li, S.V. Yellapragada, M. Mims, A. Frolov, G.A. Rivero, Significant improvement in overall survival among patients diagnosed with low-risk myelodysplastic syndrome treated with selective serotonin reuptake inhibitors, *Br. J. Haematol.* 177 (1) (2017) 142–144.
 - [105] A. Baranyi, O. Amouzadeh-Ghadikolai, D. von Lewinski, R.J. Breitenacker, H.B. Rothenhauser, C. Robier, M. Baranyi, S. Theokas, A. Meinitzer, Revisiting the tryptophan-serotonin deficiency and the inflammatory hypotheses of major depression in a biopsychosocial approach, *PeerJ* 5 (2017) e3968.
 - [106] Y. Dowlati, N. Herrmann, W. Swardfager, H. Liu, L. Sham, E.K. Reim, K.L. Lanctot, A meta-analysis of cytokines in major depression, *Biol. Psychiatry* 67 (5) (2010) 446–457.
 - [107] K.W. Kelley, R.M. Bluthé, R. Dantzer, J.H. Zhou, W.H. Shen, R.W. Johnson, S.R. Broussard, Cytokine-induced sickness behavior, *Brain Behav. Immun.* 17 (Suppl. 1) (2003) S112–S118.

Contexte du travail

Dans le cadre du Gr-Ex, le laboratoire d'excellence sur les pathologies du globule rouge, des séquençages d'exomes ont été réalisés pour explorer plusieurs cas complexes d'anémies rares. Une des patientes séquencées dans le cadre de ce projet présentait une érythroblastopénie, mais également de nombreuses pathologies auto-immunes et une leucémie à grands lymphocytes à grains (LGL). L'analyse d'exome a révélé une mutation d'une protéine nommée BLNK (B-cell Linker), impliquée dans la signalisation du BCR (B-Cell Receptor).

Le projet sur les anémies rares était mené au sein du laboratoire par Flavia Guillem. L'analyse d'exome n'ayant retrouvé aucune mutation notable impliquant l'érythropoïèse, ce cas clinique m'a ensuite été confié pour tenter d'explorer le lien entre la mutation de BLNK et le contexte auto-immun de la patiente.

Principaux résultats

Nous présentons le cas d'une femme de 43 ans présentant une leucémie à LGL associée à plusieurs maladies auto-immunes : érythroblastopénie, thyroïdite, ovarite et alopecie.

L'analyse d'exome retrouvait une mutation hétérozygote dans le gène de BLNK menant à un codon STOP dans le domaine SH2 de la protéine. Ce domaine SH2 permet le recrutement de BLNK dans la voie de signalisation du BCR. La mutation était présente dans le sang et la moelle au diagnostic, mais absente dans la salive et chez la mère de la patiente.

Aucune mutation de BLNK n'a été retrouvée après séquençage ciblé de 14 autres patients atteints de leucémie à LGL et de maladies auto-immunes de la cohorte LGL de l'hôpital Necker. Une mutation homozygote de BLNK est responsable, chez l'homme, d'un tableau d'agammaglobulinémie avec absence de lymphocytes B matures. Dans des modèles murins, l'inactivation de BLNK est également associée à des maladies auto-immunes par déficit de lymphocytes B régulateurs producteurs d'IL-10.

Le bilan biologique retrouvait une lymphopénie B et un déficit modéré en lymphocytes T CD4+, avec un taux de gammaglobulines sub-normal à 6,9 g/L (norme : 8-13,5). L'analyse immunophénotypique retrouvait une diminution des lymphocytes B régulateurs, une augmentation des lymphocytes B auto-réactifs, et une légère diminution des lymphocytes T CD4+. Quelques analyses complémentaires sont en cours, et nous souhaitons soumettre l'article à JACI sous forme de lettre à l'éditeur.

**Heterozygous BLNK mutation
associated with T-LGL leukemia and multiple autoimmune diseases**

Guillemette Fouquet¹, MD, Julien Rossignol^{1,2}, MD, PhD, Laure Ricard³, MD, Flavia Guillem¹, PhD, Vahid Asnafi⁴, MD, PhD, Felipe Suarez², MD, PhD, Lucile Couronné¹, MD, PhD, Christine Bole-Feysot⁵, PhD, Arsène Mekinian^{3,6}, MD, PhD, and Olivier Hermine^{1,2}, MD, PhD

1. Imagine Institute, INSERM U1163 and CNRS ERL 8654, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Paris, France
2. Department of Adult Hematology, Hôpital universitaire Necker-Enfants malades, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France
3. Department of internal medicine and inflammatory diseases, Sorbonnes Université, AP-HP, Hôpital Saint Antoine, Paris, France
4. Université Paris Descartes Sorbonne Cité, Institut Necker-Enfants Malades (INEM), INSERM U1151, and Laboratory of Onco-Hematology, Hôpital universitaire Necker-Enfants malades, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France
5. Genomics Core Facility, Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University Institut Imagine, Paris, France
6. Immunopathology-Biotherapy Department (DHU i2B), UMR 7211, Sorbonne University, Paris, France

Corresponding author.

Olivier Hermine, MD, PhD

Department of Adult Hematology, Hôpital universitaire Necker-Enfants malades, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France

Phone: +33.1.44.49.54.16

Fax: +33.1.44.49.53.40

E-mail: ohermine@gmail.com

Capsule summary:

We present the case of a patient with clonal T LGL and multiple autoimmune diseases, with a heterozygous acquired BLNK mutation and persistent B-cell deficiency potentially responsible for her phenotype.

Key words: B-cell linker protein, large granular lymphocyte leukemia, autoimmune diseases, regulatory B cells, regulatory T cells

Abbreviations:

BCR: B cell receptor

BLNK: B-cell linker protein (synonyms: SLP-65, BASH, BCA)

Bregs: regulatory B cells

BKT: Bruton Tyrosine Kinase

IFN γ : interferon gamma

IL-10: interleukin 10

IL-17: interleukin 17

IL-2: interleukin 2

KO: knock-out

LGL: large granular lymphocyte

SNP: single nucleotide polymorphism

Tregs: regulatory T cells

WES: whole genome sequencing

Conflicts of interest. The authors declare no conflict of interest in association with this manuscript.

Summary: 30 words – **Manuscript:** 662 words – **Figures:** 1 – **Tables:** 1 – **References:** 10

To the Editor,

LGL leukemia is a rare chronic mature lymphoproliferative disorder of either T or Natural Killer (NK) lineage, characterized by a clonal expansion of LGL resistant to activation-induced cell death. LGL leukemia can be associated with autoimmune diseases, mostly systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and autoimmune thyroiditis¹. We present the case of a 43-years old woman who presented a T-cell large granular lymphocyte (LGL) leukemia associated with multiple autoimmune diseases: autoimmune erythroblastopenia, thyroiditis, ovaritis and alopecia areata.

Blood analysis mainly showed B cell lymphopenia (CD19⁺ cells: 23/mm³; normal range: 140-400) and moderate CD4⁺ T cell deficiency (CD4⁺ cells: 480/mm³; normal range: 500-1500). The total gammaglobulins were at 6.9 g/L (normal range: 8-13.5).

She received a short course of corticosteroids and a 6-months therapy with cyclophosphamide for autoimmune erythroblastopenia, which allowed complete remission of erythroblastopenia concomitantly to the disappearance of the LGL clone.

Because of this unusual association of multiple autoimmune diseases, we performed whole exome sequencing which revealed the presence of a heterozygous nonsense mutation in the BLNK (B-cell linker) gene, c.1102 C>T, p.Q368*, leading to a premature STOP codon. This mutation was located in the C-terminal SH2 domain of BLNK, which allows the recruitment of BLNK to the B cell receptor (BCR) complex through its interaction with BTK (Bruton Tyrosine Kinase). No STAT3 mutation was found. We performed BLNK targeted sequencing on sorted medullary populations at diagnosis: T-cells (CD3⁺), B-cells (CD19⁺), monocytes (CD14⁺) and others (CD3⁻, CD19⁻, CD14⁻). We found the same heterogeneous BLNK mutation in all populations, suggesting an early clonal mutation. We did not find this mutation in the patient's saliva, arguing for an acquired mutation.

BLNK targeted sequencing was performed in another 14 patients with clonal LGL and autoimmune diseases from Necker's hospital LGL cohort (**Table 1**) and no BLNK mutation was found among these 14 tested patients.

	Age at LGL diagnosis (years)	Type of LGL	Associated autoimmune diseases
1	38	T LGL	Rheumatoid arthritis
2	41	T LGL	Immune thrombocytopenia
3	54	T LGL	Autoimmune enteropathy
4	73	T LGL	Rheumatoid arthritis Immune thrombocytopenia

5	87	T LGL	Cold agglutinin disease
6	70	T LGL	Vasculitis Autoimmune hemolytic anemia
7	58	T LGL	Rheumatoid arthritis
8	33	NK LGL	Autoimmune hemolytic anemia
9	61	T LGL	Rheumatoid arthritis Sjögren's syndrome Pyoderma gangrenosum
10	50	T LGL	Autoimmune hemolytic anemia
11	72	T LGL	Celiac disease
12	79	T LGL	Rheumatoid arthritis
13	36	T LGL	Autoimmune hemolytic anemia
14	58	T LGL	Inflammatory undetermined arthritis

Table 1. Characteristics of patients with clonal LGL and autoimmune diseases.

In order to determine the potential functional relevance of this BLNK mutation, we performed flow cytometry analysis of B and T cell subpopulations. This analysis showed preserved distribution of various B cells subpopulations, and increased proportion of CD27⁻CD21^{low} B cells, previously described as autoreactive B cells². The various regulatory B cells analyses showed an important decrease in CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}³, without significant decrease in other regulatory B cells: CD24^{hi}CD27⁺ (B10) and CD27^{int}CD38^{hi} (plasmablasts)⁴. We observed a decrease in the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}Foxp3⁺ regulatory T cells (**Figure 1**). Functional exploration of B and T populations was inconclusive due to the patient's B-cell lymphopenia.

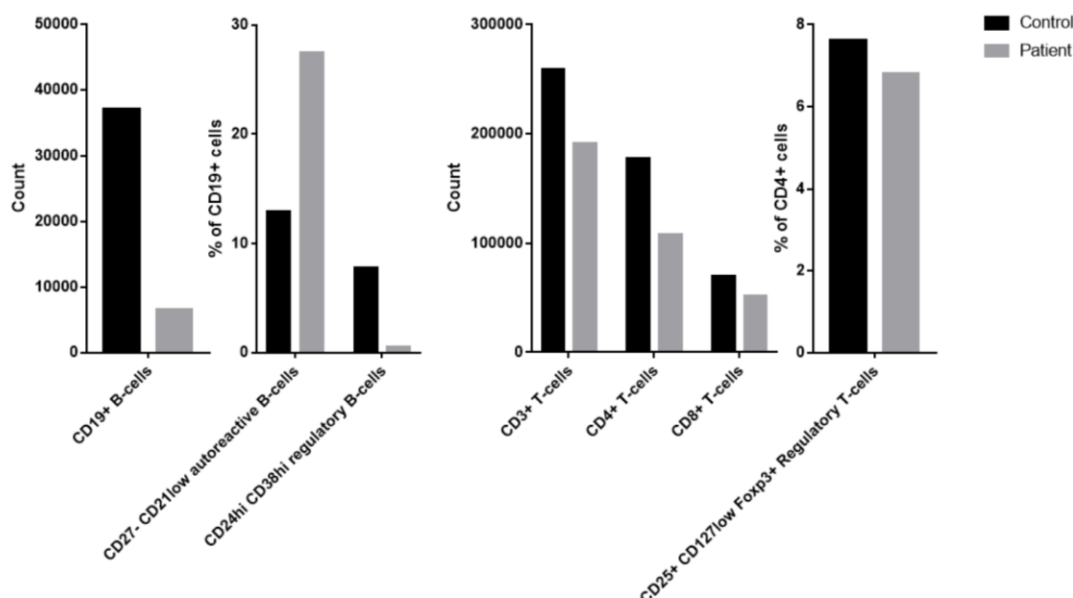


Figure 1. Flow cytometry analyses of B and T-cells subpopulations.

The BLNK protein is an adaptor protein expressed in B cells and macrophages, which plays a major role in BCR signaling. Mutations affecting the pre-BCR's signaling pathway result in severe B-cell differentiation blockades at the pre-B1 to pre-B2 cell transition, leading to primary B-cell immunodeficiencies characterized by absent or nearly absent circulating B cells, severe hypo- or agammaglobulinemia and recurrent bacterial infections⁵. BLNK knock-out mice display a block in pre-B cell development and reduced numbers of mature B cells, but also autoimmune diseases associated with decreased B-cell and regulatory T-cell percentages⁶.

In humans, the function of BLNK in B cells seems non redundant⁷. A few cases of homozygous BLNK mutations have been described, all led to nearly absent circulating B cells and severe hypo- or agammaglobulinemia^{5, 7-9}.

As far as we know, this is the first report about a heterozygous BLNK mutation. Our patient presented an association of multiple autoimmune disorders, whose pathogenic mechanism remains to be determined and could involve B cells – as usually in other idiopathic autoimmune conditions and as in BLNK knock-out mice. She also presented a clonal T LGL leukemia, which is not known to involve B cells. However, it has recently been shown that the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab, a specific anti-B-cell drug, has some efficacy on a monoclonal T LGL disease¹⁰.

In conclusion, we present the case of a patient presenting a heterozygous acquired BLNK mutation, a clonal T LGL and multiple autoimmune diseases. We believe the BLNK mutation could explain the clinical phenotype mainly through persistent B cell deficiency.

References.

1. Lamy T, Moignet A, Loughran TP, Jr. LGL leukemia: from pathogenesis to treatment. *Blood* 2017; 129:1082-94.
2. Isnardi I, Ng YS, Menard L, Meyers G, Saadoun D, Srdanovic I, et al. Complement receptor 2/CD21- human naive B cells contain mostly autoreactive unresponsive clones. *Blood* 2010; 115:5026-36.
3. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 2010; 32:129-40.
4. Mauri C, Menon M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J Clin Invest* 2017; 127:772-9.
5. Conley ME, Dobbs AK, Farmer DM, Kilic S, Paris K, Grigoriadou S, et al. Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:199-227.
6. Jin G, Hamaguchi Y, Matsushita T, Hasegawa M, Le Huu D, Ishiura N, et al. B-cell linker protein expression contributes to controlling allergic and autoimmune diseases by mediating IL-10 production in regulatory B cells. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131:1674-82.
7. Lagresle-Peyrou C, Millili M, Luce S, Boned A, Sadek H, Rouiller J, et al. The BLNK adaptor protein has a nonredundant role in human B-cell differentiation. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134:145-54.
8. NaserEddin A, Shamriz O, Keller B, Alzyoud RM, Unger S, Fisch P, et al. Enteroviral Infection in a Patient with BLNK Adaptor Protein Deficiency. *J Clin Immunol* 2015; 35:356-60.
9. van Zelm MC, Geertsema C, Nieuwenhuis N, de Ridder D, Conley ME, Schiff C, et al. Gross deletions involving IGHM, BTK, or Artemis: a model for genomic lesions mediated by transposable elements. *Am J Hum Genet* 2008; 82:320-32.
10. Cornec D, Devauchelle-Pensec V, Jousse-Joulin S, Marhadour T, Ugo V, Berthou C, et al. Long-term remission of T-cell large granular lymphocyte leukemia associated with rheumatoid arthritis after rituximab therapy. *Blood* 2013; 122:1583-6.

Contexte du travail

La ciclosporine A est connue et utilisée depuis longtemps pour ses propriétés immunosuppressives, principalement dans le cadre de la transplantation d'organes. L'effet principal de la ciclosporine repose sur l'inhibition de l'activité des lymphocytes T, ce qui explique son rôle dans la prévention du rejet des greffons.

Plus récemment, des données ont révélé un effet paradoxal d'une faible dose de ciclosporine A, ayant des propriétés immunomodulatrices différentes des fortes doses. C'est ce sujet que nous avons voulu développer ici.

Cette revue s'inscrit dans le cadre du travail de thèse de Camila Flores, portant sur le rôle de modulation immunitaire de la ciclosporine A à faible dose dans la réponse anti-tumorale du système immunitaire adaptatif. J'ai été impliquée dans certains aspects de son travail de thèse, et j'ai également participé à l'écriture de cette revue avec elle.

Principaux résultats

Dans cette revue, après un rappel sur la ciclosporine et ses doses, nous avons discuté des effets paradoxaux de la ciclosporine A à faible dose et de leurs applications possibles.

Ainsi, si les fortes doses de ciclosporine inhibent l'activation des lymphocytes T, certaines études montrent que les faibles doses peuvent au contraire stimuler la réponse immunitaire. La ciclosporine à faible dose pourrait dans certains cas activer les lymphocytes T cytotoxiques et favoriser la production de cytokines pro-inflammatoires, mais également inhiber les lymphocytes T régulateurs.

Certaines études suggèrent que la ciclosporine à faible dose pourrait améliorer la survie post-allogreffe de moelle, en augmentant l'effet bénéfique greffe-versus-leucémie (GVL) sans augmenter l'effet toxique du greffon contre l'hôte (GVH).

Même si les données cliniques sont rares, la ciclosporine à faible dose pourrait également avoir un effet anti-tumoral – effet qui est exploré de façon plus approfondie dans le travail de thèse de Camila Flores.

Ainsi, la ciclosporine à faible dose pourrait représenter une nouvelle stratégie thérapeutique dans plusieurs situations, et en particulier dans le traitement du cancer.



Lessons to Learn From Low-Dose Cyclosporin-A: A New Approach for Unexpected Clinical Applications

Camila Flores^{1,2*}, Guillemette Fouquet^{1,2}, Ivan Cruz Moura^{1,2}, Thiago Trovati Maciel^{1,2} and Olivier Hermine^{1,2,3}

¹ INSERM UMR1163 and CNRS URL 8254, Imagine Institute, Paris, France, ² Paris Descartes University-Sorbonne Paris Cité, Paris, France, ³ Department of Hematology, Necker Children's Hospital, APHP, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Lionel Apetoh,
Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale (INSERM),
France

Reviewed by:

Miriam B. F. Werneck,
Federal University of Rio de Janeiro,
Brazil
Carlos Alfaro,
NavarraBiomed, Spain
Onur Boyman,
University of Zurich, Switzerland

*Correspondence:

Camila Flores
dr.camilafl@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Cancer Immunity and Immunotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 03 December 2018

Accepted: 05 March 2019

Published: 28 March 2019

Citation:

Flores C, Fouquet G, Moura IC,
Maciel TT and Hermine O (2019)
Lessons to Learn From Low-Dose
Cyclosporin-A: A New Approach for
Unexpected Clinical Applications.
Front. Immunol. 10:588.
doi: 10.3389/fimmu.2019.00588

Cyclosporin-A has been known and used for a long time, since its “fast track” approval in the early 80's. This molecule has rapidly demonstrated unexpected immunosuppressive properties, transforming the history of organ transplantation. Cyclosporin's key effect relies on modulation on T-lymphocyte activity, which explains its role in the prevention of graft rejection. However, whether cyclosporin-A exerts other effects on immune system remains to be determined. Until recently, cyclosporin-A was mainly used at a high-dose, but given the drug toxicity and despite the fear of losing its immunosuppressive effects, there is nowadays a tendency to decrease its dose. The literature has been reporting data revealing a paradoxical effect of low dosage of cyclosporin-A. These low-doses appear to have immunomodulatory properties, with different effects from high-doses on CD8+ T lymphocyte activation, auto-immune diseases, graft-vs.-host disease and cancer. The aim of this review is to discuss the role of cyclosporin-A, not only as a consecrated immunosuppressive agent, but also as an immunomodulatory drug when administrated at low-dose. The use of low-dose cyclosporin-A may become a new therapeutic strategy, particularly to treat cancer.

Keywords: cyclosporin-A, low-dose, oncology, lymphocytes, immunotherapy, cytokines

INTRODUCTION

Cyclosporin-A (CsA) is a fungus-derived molecule (*Tolypocladium inflatum*), discovered in 1970 by Borel and Stahelin (1) in an attempt to develop a new antifungal treatment (2, 3). In 1971, its immunosuppressive properties were identified in a screening test (1, 4) and in 1976, its chemical structure was determined (3, 5). CsA is a neutral, lipophilic, cyclic endecapeptide consisting of 11 amino acids with a molecular weight of 1202,6 Daltons (6–8).

High-dose CsA is a very potent and relatively selective inhibitor of T lymphocyte activation, with minimal effects on already activated cytotoxic/suppressor CD8 T cells, granulocytes and macrophages, which represents a significant advantage compared to some other immunosuppressive drugs (9). In addition, it has been shown that CsA has no effect on the function of phagocytic cells, does not cause bone marrow suppression (1, 7, 10, 11), and its action on immune competent lymphocytes is reversible (1).

High-dose CsA selectively blocks T-cell receptor-induced proliferation, differentiation and cytokine production (10–13), even though activated T-cells may still be able to express interleukin 2 receptor (IL-2R) and proliferate in the presence of interleukin 2 (IL-2) (14). The main target

of CsA is the T-helper cell subset, however CsA also shows a weak inhibitory effect on CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cells and can therefore modulate the host immune tolerance (15). There is also evidence that CsA may interfere with the function of some B cell subsets, whose co-operation with T-cells is essential for their activation (16) and antigen presentation by accessory cells (2, 3, 17, 18). CsA can hamper B cells function both directly and indirectly through interaction with T cells (19).

CsA belongs to the family of calcineurin inhibitors (for further information on CsA mechanism of action please see **Figure 1**). CsA binds with great affinity to cyclophilins, and particularly to the cytosolic 17 kDa cyclophilin-A, a family of cytoplasmic proteins present in most of the T-cells (11, 20, 21). The drug-receptor complex specifically and competitively binds to calcineurin, a calcium/calmodulin dependent serine threonine protein phosphatase, provoking its inhibition (11, 22). This process restricts the dephosphorylation of a family of transcription factors, the nuclear factor of activated T-cells (NFAT) family (23). High-dose CsA prevents NFAT's translocation from the cytoplasm to the nucleus, decreasing the transcription of several immunologically important factors such as interleukins (IL-2, IL-3, IL-4), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interferon-gamma (IFN- γ) (21, 22, 24, 25). For instance, it has been demonstrated that high-dose CsA—but not low dose CsA—directly inhibits the expression of NFATc1 and IL-2 in human T cells from stimulated whole blood samples, assessed by flow cytometry (23). Therefore, unlike other cytotoxic immune suppressors, CsA does not kill the immune effector cells but rather selectively inhibits their proliferative activation and expansion, mainly by interfering with IL-2 synthesis, which is essential for the activation and differentiation of T lymphocytes.

Upon administration, CsA is found widely distributed in the extravascular space, with an average apparent distribution volume of 3.5 L/kg. In the blood, the distribution is as follows: 33–47% in plasma, 4–9% in lymphocytes, 5–12% in granulocytes and 41–58% in red blood cells. In plasma, about 90% of CsA is bound to proteins, mainly lipoproteins (7).

CsA is metabolized mainly by the liver to about 15 metabolites, through the cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) and P-glycoprotein. The main metabolic pathways involved are monohydroxylation, dihydroxylation, and N-demethylation at different positions within the molecule (26).

The bioavailability of CsA is influenced by its intestinal absorption, which leads to inter-individual variability (27). Several factors are known to have an impact on intestinal absorption, such as: time post-graft, bile flow, dietary composition, gastrointestinal state, liver function, small bowel length and vehicle of CsA (15). The elimination occurs essentially by biliary excretion and feces (11), with only 6% of the dose excreted in the urine after oral administration (8). The terminal elimination half-life varies from 6.3 h in healthy

TABLE 1 | Characterization of cyclosporin-A (CsA) dose effects.

	High-dose CsA	Low-dose CsA
Dose per day	≥ 4 –5 mg/kg	≤ 3 mg/kg
Target concentration	> 150 ng/ml	< 150 ng/ml
T-cell proliferation	Decreased/abolished	Maintained
Cytokine production	Decreased/abolished	Maintained
Increased auto-immunity	No	Yes
Increased anti-cancer immunity	No	Yes

volunteers to 20.4 h in patients with severe hepatic disease. The half-life in renal transplant patients is ~ 11 h, ranging from 4 to 25 h (26, 28). The time to peak blood CsA concentration ranges from 1.2 to 2 h following oral administration.

CsA IN CLINICAL SETTINGS

High-Dose CsA

Rapidly after its discovery, CsA has changed paradigms in the immunosuppression field due to its ability to prevent acute organ rejection and thus improve overall survival in kidney (29) and in liver transplant (30). The first treated patient was a 28-year-old woman who received a liver transplant in 1980 (30).

The success of the clinical use of CsA led to its rapid approval by the Food and Drug Administration (FDA) in 1983 (31) and it has fundamentally transformed the field of organ transplantation compared to other immune suppressants (32). Beside its role to prevent rejection after solid organ transplantation, CsA is also indicated for preventive or curative treatment of graft-vs.-host disease (GVHD) (33) and treatment of inflammatory disorders such as psoriasis (34), atopic dermatitis (35), nephrotic syndromes (36), or rheumatoid arthritis (37).

Adverse effects of CsA include: nephrotoxicity, neurotoxicity (convulsions, encephalopathy, anxiety, and headache), hepatotoxicity, cardiovascular toxicity (hypertension, arrhythmia), diarrhea, endocrinological, and metabolic toxicity (dyslipidemia, hypomagnesaemia, hyperkalemia, gynecomastia, and hypertrichosis). Unfortunately, these undesirable toxicities emerged simultaneously with CsA's immunosuppressive benefits. In the early era, CsA was used at high doses, up to 25 mg/kg per day following transplant (7, 29). These unacceptable toxicities then led to a necessary dose reduction.

Low-Dose CsA

If doses above 20 mg/kg per day can be defined without doubt as high doses, the definition of “low-dose” CsA is less clear. In general, CsA is initially administrated up to 20 mg/kg per day following solid organ transplant in adults, then decreased every week until 5 to 10 mg/kg per day. In auto-immune and inflammatory diseases, CsA is rather used at doses around 4 to 6 mg/kg per day. After allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), CsA is often prescribed at 1 mg/kg per day and adjusted to provide therapeutic blood levels from 150 to 400 ng/mL (38), even though the target concentration can vary depending on clinical protocols, type of allograft, risk of rejection, concomitant immunosuppressive medications, and

Abbreviations: CsA, cyclosporin-A; EAE, experimental allergic encephalomyelitis; GVHD, graft-vs.-host disease; GVL, graft-vs.-leukemia; HLA, human leukocyte antigen; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; IL-2, interleukin 2; IL-2R, interleukin 2 receptor; IFN- γ , interferon-gamma; NFAT, nuclear factor of activated T-cells; TNF- α , tumor necrosis factor alpha.

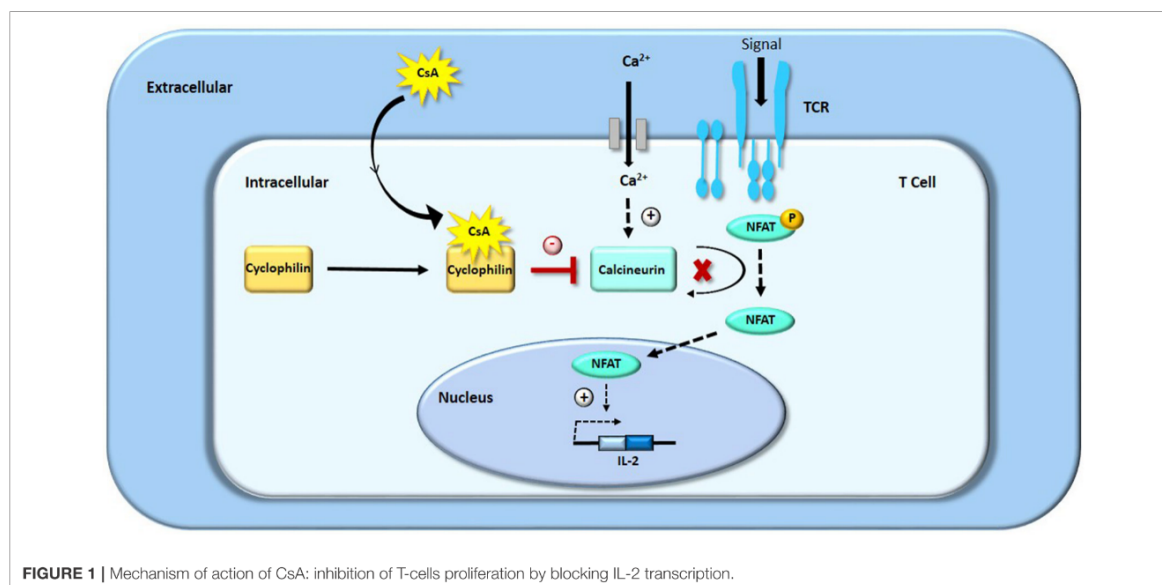


FIGURE 1 | Mechanism of action of CsA: inhibition of T-cells proliferation by blocking IL-2 transcription.

toxicity (32, 38). Doses below 3 mg/kg per day are generally considered as low doses, and doses above 4 mg/kg can already be considered as high doses depending on studies.

The first attempts of lowering CsA doses aimed at decreasing its side effects while maintaining optimal efficacy. The nephrotoxicity of CsA correlates with duration of treatment and dose, and is reversible after dose reduction. The fear of losing the immunosuppressive effect of CsA due to dose reduction led to the development of protocols including antilymphocytic antibodies in the early post-transplant period (39), also allowing to avoid early CsA exposure before full recovery of the allograft function. Subsequently, decreasing the dose of CsA demonstrated improved outcomes in organ transplant (4, 40).

As detailed below, several reports revealed a paradoxical effect of low dosage CsA, such as immunomodulatory properties (14, 41), anti-GVHD (42), and anti-cancer effects (43).

CLINICAL APPLICATIONS FOR LOW-DOSE CsA

Immunomodulatory Properties

If high-dose CsA inhibits T-cells activation, evidence shows that low-dose CsA can induce pro-inflammatory cytokines, as well as autoimmunity and immune hyperreactivity (14). The suppressive activity of CsA on T lymphocytes was first challenged by Bretscher et al. (44), who found that low-dose CsA can activate the cell-mediated immune response (Table 1). It has also been suggested that low-dose CsA inhibits regulatory T-cells activity *in vitro* whereas this effect is weak with higher doses (45). Low-dose CsA may therefore be considered to stimulate immune response in specific conditions (41).

In mice models, it has been shown that low-dose CsA induces pro-inflammatory cytokines such as IL-12, IFN- γ and TNF- α (46). Another study demonstrated that mice treated with low-dose CsA (5×10^{-55} mg/kg per day) presented an accelerated allograft skin rejection, a decreased CD4⁺ CD25^{hi} FoxP3⁺ regulatory T-cell subpopulation, and an activation of innate immunity, when compared to animals receiving high-dose CsA (15 mg/kg per day) or placebo (46).

Under some circumstances, CsA can paradoxically augment delayed-type hypersensitivity responses, aggravate autoimmune diseases and induce specific forms of autoimmunity (14). The authors reported that CsA can aggravate and/or induce relapse in several autoimmune diseases including collagen-induced arthritis, encephalomyelitis and autoimmune thyroiditis, suggesting that CsA may enhance immune responses by inactivating suppressor cells, altering Th1/Th2 antagonism or promoting T cell activation through a CsA-resistant IL2-independent T cell activation (14).

In a study on experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in rats, low-dose CsA (3 mg/kg per day) had a minor protective effect during the acute disease state (day 10 to 17 post-immunization) (47). However, while EAE control rats recovered from the disease, rats treated with low-dose CsA presented a severe disease relapse 20–30 days post immunization, whereas high-dose CsA (20 mg/kg per day) completely protected rats from EAE. This relapse was associated to increased numbers of cells spontaneously producing IFN- γ in the central nervous system and regional lymph nodes. The authors also showed an increase of anti-myelin and anti-MBP (myelin basic protein) secreting cells, as well as primed T cells that produced IFN- γ in response to myelin antigens. They suggested that low-dose CsA could interfere with systemic

down-regulatory mechanisms acting on both T-cell and B-cell myelin-directed autoimmunity.

GVHD

Immunosuppression is crucial in solid organ transplant to prevent rejection, but also in allogeneic HSCT to prevent GVHD. CsA associated with a short course of methotrexate has been the most common immunosuppressive regimen in allogeneic HSCT since CsA's approval in 1983 (5, 48). CsA was initially used at doses up to 10 to 20 mg/kg per day, and subsequently lowered to 3 to 5 mg/kg per day because of unacceptable toxicity.

It has been shown that high-dose CsA efficiently reduces the incidence of severe GVHD, but also decreases the graft-vs.-leukemia (GVL) effect, increasing the rate of leukemic relapses (49). In contrast, Olsson et al. (42) demonstrated that low-dose CsA (1 mg/kg I.V. per day) improved survival in leukemic recipients of HLA-identical sibling transplants in comparison with high-dose CsA (5 to 7.5 mg/kg I.V. per day). This retrospective study reported that, compared to patients on high-dose CsA, patients on low-dose CsA had an increased probability of developing acute GVHD grades I–II (70 vs. 53%, $p < 0.01$), and chronic GVHD (58 vs. 25%, $p < 0.01$), whereas the incidences of acute GVHD grades III–IV (9 vs. 5%, $p = 0.62$) and non-relapse mortality (20 vs. 22%, $p = 0.58$) were similar. This was associated with a decreased probability of relapse (31 vs. 54% $P < 0.01$) and an improved relapse-free survival (56 vs. 38%, $p < 0.04$) and overall survival (61 vs. 40%, $p < 0.04$) under low-dose CsA regimen. In multivariate analyses, low-dose CsA remained strongly associated with chronic GVHD (hazard ratio 2.56, $p < 0.01$), decreased risk of relapse (hazard ratio 0.46, $p < 0.01$) and increased probability of survival (hazard ratio 1.84, $p < 0.01$).

These results suggest that low-dose CsA used for GVHD prophylaxis in allogeneic HSCT could improve survival by improving GVL effect without increasing severe acute GVHD—keeping in mind that this is a retrospective study, restricted to HLA-identical sibling transplants recipients treated for leukemia.

To note, it has also been suggested that selective NFAT targeting in T cells could improve GVHD while maintaining the beneficial GVL effect (50).

Cancer

Anti-cancer therapy is perhaps the most significant application for low-dose CsA and its putative role in immune system activation. In a phase I/II trial on 44 patients with advanced non-small cell lung carcinoma (NSCLC), low-dose CsA (1–2 mg/kg per day) was compared to high-dose CsA (3–6 mg/kg per day) in association with Etoposide and Cisplatin (43). In this small series, the authors reported a significant increase in survival of patients treated with low-dose CsA, with a 2-year survival of 25% compared to 4% with high-dose CsA. The Kaplan-Meier survival curves were significantly different for these two groups by the log-rank test ($p = 0.047$). Although no conclusions should be drawn from this small study, this suggests that low-dose CsA could, in some situations, be a therapeutic approach in cancer.

CsA is known to be a specific inhibitor of the nuclear factor of activated T-cells (NFAT) pathway (Figure 1), and emerging evidence suggests that NFAT signaling plays an important role in

tumorigenesis and tumor growth. The overexpression of several isoforms of NFAT has been detected in pancreatic, pulmonary or hepatic carcinomas, as compared with their corresponding normal tissues (51–53). The isoform NFATc1 seems to act as an oncogene as a constitutively active form of NFATc1 is able to induce neoplastic transformation of fibroblast cells, whereas the isoform NFATc2 rather seems to act as a tumor suppressor (54). NFATc1 has been shown to promote tumor progression in pancreatic cancer (51), melanoma (55), and breast cancer (56), and to be implicated in lymphangiogenesis (57). Some studies have demonstrated an antitumor effect of various doses of cyclosporin A in bladder (58) and prostate cancer (59).

At high doses, it has been shown that CsA is able to reduce the growth of cancer cells *in vitro*, by inducing cycle cell arrest, apoptosis or necroptosis in colon cancer (60, 61), gastric cancer (62) or squamous cell carcinoma (63). CsA's impact in these studies however seems to be mainly tumoristic, and is not observed for all cancer cells: for instance, breast cancer cells are refractory to CsA (60). To our knowledge, no published study has demonstrated a direct effect of low-dose CsA on cancer cells.

In hematology, low-dose CsA has also been used in combination with Cytarabine and Daunorubicin in patients with acute myeloid leukemia (64). The complete hematological remission rate after the first cycle of induction was higher in the CsA group (63.6 vs. 30%; $p = 0.09$). However, relapse rate and mortality were higher in the CsA group, resulting in the lack of significant improvement in outcome. Despite these disappointing results, the increase of response rate can suggest an anti-leukemic effect of low-dose CsA.

Considering the action of CsA on T-cells, it was suggested that CsA could be potentially effective in the treatment of T-cell neoplasms. A study was performed in 16 patients with refractory T-cell lymphoma (peripheral T-cell lymphoma or cutaneous T-cell lymphoma) using high-dose CsA (15 mg/kg per day) (65). Most patients in this trial did not respond to high-dose CsA, suggesting either that these malignancies are IL-2 independent or that CsA could not reach its intracellular target. Only two patients responded to high-dose CsA, but rapidly relapsed after a temporary halt in therapy, arguing for a cytostatic or anti-inflammatory effect rather than a cytotoxic effect of CsA. However, this study has limitations regarding our subject of interest since it assessed only high-dose CsA and lack of efficacy of CsA monotherapy in these high-risk diseases could be expected. To our knowledge, no study has been conducted with low-dose CsA on hematologic neoplasms, therefore, CsA's role on anti-tumor immunity in this setting remains unknown.

More recently, a case report described a remarkable efficacy of CsA in a patient with advanced thymoma (66). CsA was used at 5 mg/kg per day and was then adjusted to maintain serum levels of 100–150 ng/ml, corresponding to a low-dose CsA regimen. The patient, initially diagnosed with a microinvasive thymoma and subjected to thymectomy, relapsed 10 years later with the same histology. After being treated with methylprednisolone pulses followed by a complete resection of the recurrent thymoma, the patient relapsed with disseminated recurrent thymoma and pure red blood cell aplasia, for which she received CsA. Interestingly,

the patient was cured for red blood cell aplasia and all thymoma lesions disappeared without any additional therapy.

The potential therapeutic window of CsA appears to be relatively narrow in the context of cancer, particularly because of its controversial effect on regulatory T cells (T-regs). In some studies, low-dose CsA has been shown to inhibit T-regs activity *in vitro* whereas this effect was weak with higher doses (45). However, in patients with atopic dermatitis, low-dose CsA increased (67), while high-dose CsA reduced (68), the T-reg population. In mice, treatment with low-dose CsA was shown to decrease the T-reg population and accelerate graft rejection (46), while low-dose CsA induced tolerance in a model of kidney graft with strong histoincompatibility in rats (69). In another study in mice, high-dose CsA inhibited T-regs and impaired their immunosuppressive function (70). Since T-regs are usually considered to promote tumors, low-dose CsA could be detrimental in some cancer settings. However, T-regs are a heterogeneous subset of immunosuppressive T cells, which do not always favor tumor progression and can be beneficial to the patient (71).

In summary, even though clinical data are scarce, low-dose CsA could represent an effective, safe, low-cost therapy for several kinds of cancer. However, the impact of low-dose CsA on tumors requires further studies to increase our understanding of its immunological effects.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

CsA is a molecule known and used for almost 40 years for its immunosuppressive properties. Over time, it has been revealed

that CsA is able to activate or inhibit the immune system, in a dose dependent manner. Thus, one could suggest several possible uses of CsA, adapting the dose to the desired impact. Low-dose CsA seems to have a negative effect on situations like hyper-reactivity and autoimmune diseases. However, in cases such as allogeneic HSCT and GVHD prophylaxis, low-dose CsA has proven its efficacy. There are significant arguments to support low-dose of CsA as a promising strategy in the arsenal against cancer, whether as monotherapy or in combination with drugs. Further investigations on its therapeutic efficacy and prognosis impact are yet needed. We are currently observing an increased use of immunotherapies such as anti-checkpoint inhibitors or CAR-T cells. CsA combination may modulate immunotherapies either at high-dose, decreasing their toxicities, or at low-dose to increase their efficacy. Low-dose CsA may give rise to major contributions to medicine and notably to the field of oncoimmunology.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

ACKNOWLEDGMENTS

CF is supported by Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). GF is supported by Institut National du Cancer (INCA). This work was supported by the Ligue Nationale contre le Cancer (grant EL2015.LNCC/OH and EL2018.LNCC/OH).

REFERENCES

- Borel JF, Feuer C, Gubler HU, Stähelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Act.* (1976) 6:468–75. doi: 10.1007/BF01973261
- Borel JF. Comparative study of *in vitro* and *in vivo* drug effects on cell-mediated cytotoxicity. *Immunology.* (1976) 31:631–41.
- Heusler K, Pletscher A. The controversial early history of cyclosporin. *Swiss Med Wkly.* (2001) 131:299–302.
- Borel J, Kis Z, Beveridge T. The history of the discovery and development of Cyclosporin (Sandimmune®). In: Merluzzi VJ, Adams J, editors. *The Search for Anti-Inflammatory Drugs Case Histories From Concept to Clinic*. Boston: Birkhäuser (1995) p. 27–63.
- Ruegger A, Kuhn M, Lichti H, Loosli HR, Huguenin R, Quiquerez C, et al. [Cyclosporin A, a Peptide Metabolite from *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers.) Rifai, with a remarkable immunosuppressive activity]. *Helvet Chim Acta.* (1976) 59:1075–92. doi: 10.1002/hlca.19760590412
- Allison AC. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology.* (2000) 47:63–83. doi: 10.1016/S0162-3109(00)00186-7
- Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med.* (1989) 321:1725–38. doi: 10.1056/NEJM198912213212507
- Tedesco D, Haragsim L. Cyclosporine: a review. *J Transplant.* (2012) 2012:1–7. doi: 10.1155/2012/230386
- Shevach EM. The effects of cyclosporin A on the immune system. *Ann Rev Immunol.* (1985) 3:397–423. doi: 10.1146/annurev.iy.03.040185.002145
- Kronke M, Leonard WJ, Depper JM, Arya SK, Wong-Staal F, Gallo RC, et al. Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. *Proc Natl Aca Sci USA.* (1984) 81:5214–8. doi: 10.1073/pnas.81.16.5214
- Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology.* (2000) 47:119–25. doi: 10.1016/S0162-3109(00)00192-2
- Herold KC, Lancki DW, Moldwin RL, Fitch FW. Immunosuppressive effects of cyclosporin A on cloned T cells. *J Immunol.* (1986) 136:1315–21.
- Granelli-Piperno A. *In situ* hybridization for interleukin 2 and interleukin 2 receptor mRNA in T cells activated in the presence or absence of cyclosporin A. *J Exp Med.* (1988) 168:1649–58. doi: 10.1084/jem.168.5.1649
- Prud'homme GJ, Parfrey NA, Vanier LE. Cyclosporine-induced autoimmunity and immune hyperreactivity. *Autoimmunity.* (1991) 9:345–56. doi: 10.3109/08916939108997137
- Tapia C, Pellegrini MV. Cyclosporine. *StatPearls.* Treasure Island; Florida, FL: StatPearls Publishing LLC (2018).
- Motta I, Truffa-Bachi P. Influence of cyclosporin A on humoral immunity and on B lymphocyte activation. In: Thomson AW, editor. *Cyclosporin. Mode of Action and Clinical Applications*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. (1989). p. 34–69.
- Esa AH, Converse PJ, Hess AD. Cyclosporine inhibits soluble antigen and alloantigen presentation by human monocytes *in vitro*. *Int J Immunopharmacol.* (1987) 9:893–902. doi: 10.1016/0192-0561(87)90005-1
- Little RG II, Ebertowski LA, David CS. Cyclosporine A inhibition of alloantigen presentation. *Transplant Proc.* (1991) 23(2 Suppl. 2):6–9.
- Hannam-Harris AC, Taylor DS, Nowell PC. Cyclosporin A directly inhibits human B-cell proliferation by more than a single mechanism. *J Leukocyte Biol.* (1985) 38:231–9. doi: 10.1002/jlb.38.2.231
- Colgan J, Asmal M, Yu B, Luban J. Cyclophilin A-deficient mice are resistant to immunosuppression by cyclosporine. *J Immunol.* (2005) 174:6030–8. doi: 10.4049/jimmunol.174.1.6030

21. Pallet N, Fernández-Ramos AA, Lorient M-A. Impact of Immunosuppressive Drugs on the Metabolism of T Cells. In: Braaten D, editor. *International Review of Cell and Molecular Biology*. New York, NY: Elsevier (2018). p. 169–200.
22. Wiederrecht G, Lam E, Hung S, Martin M, Sigal N. The mechanism of action of FK-506 and cyclosporin A. *Ann N Y Acad Sci.* (2006) 696:9–19. doi: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb17137.x
23. Brandt C, Liman P, Bendfeldt H, Mueller K, Reinke P, Radbruch A, et al. Whole blood flow cytometric measurement of NFATc1 and IL-2 expression to analyze cyclosporine A-mediated effects in T cells. *Cytometry Part A.* (2010) 77A:607–13. doi: 10.1002/cyto.a.20928
24. Barbarino JM, Staats CE, Venkataramanan R, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary. *Pharmacogen Genom.* (2013) 23:563–85. doi: 10.1097/FPC.0b013e328364db84
25. Naesens M, Sarwal MM. Harnessing the diversity of the human T-cell repertoire: a monitoring tool for transplantation tolerance? *Eur J Immunol.* (2010) 40:2986–9. doi: 10.1002/eji.201041047
26. Wang C-e, Lu K-P, Chang Z, Guo M-L, Qiao H-L. Association of CYP3A4*1B genotype with Cyclosporin A pharmacokinetics in renal transplant recipients: a meta-analysis. *Gene.* (2018) 664:44–9. doi: 10.1016/j.gene.2018.04.043
27. Naesens M, Kuypers DRJ, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol.* (2009) 4:481–508. doi: 10.2215/CJN.04800908
28. Henny FC, Kleinbloesem CH, Moolenaar AJ, Paul LC, Breimer DD, Van Es LA. Pharmacokinetics and nephrotoxicity of cyclosporine in renal transplant recipients. *Transplantation.* (1985) 40:261–5. doi: 10.1097/00007890-198509000-00008
29. Calne RY, Thiru S, McMaster P, Craddock GN, White DJG, Evans DB, et al. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet.* (1978) 312:1323–7. doi: 10.1016/S0140-6736(78)91970-0
30. Starzl TE, Klintmalm GBG, Porter KA, Iwatsuki S, Schröter GPJ. Liver transplantation with use of cyclosporin A and prednisone. *N Engl J Med.* (1981) 305:266–9. doi: 10.1056/NEJM198107303050507
31. Kolata G. FDA Speeds approval of cyclosporin. *Science.* (1983) 221:1273. doi: 10.1126/science.221.4617.1273-a
32. Moyer TP, Post GR, Sterioff S, Anderson CF. Cyclosporine nephrotoxicity is minimized by adjusting dosage on the basis of drug concentration in blood. *Mayo Clin Proc.* (1988) 63:241–7. doi: 10.1016/S0025-6196(12)65097-6
33. Ruutu T, van Biezen A, Hertenstein B, Henseler A, Garderet L, Passweg J, et al. Prophylaxis and treatment of GVHD after allogeneic haematopoietic SCT: a survey of centre strategies by the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* (2012) 47:1459–64. doi: 10.1038/bmt.2012.45
34. Soleymani T, Vassantachart JM, Wu JJ. Comparison of guidelines for the use of cyclosporine for psoriasis: a critical appraisal and comprehensive review. *J Drugs Dermatol.* (2016) 15:293–301.
35. Arkwright PD, Motala C, Subramanian H, Spergel J, Schneider LC, Wollenberg A. Management of difficult-to-treat atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol Pract.* (2013) 1:142–51. doi: 10.1016/j.jaip.2012.09.002
36. Buscher AK, Beck BB, Melk A, Hoefele J, Kranz B, Bamborschke D, et al. Rapid response to cyclosporin A and favorable renal outcome in nongenetic versus genetic steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol.* (2016) 11:245–53. doi: 10.2215/CJN.07370715
37. Chighizola CB, Ong VH, Meroni PL. The Use of Cyclosporine A in rheumatology: a 2016 comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol.* (2017) 52:401–23. doi: 10.1007/s12016-016-8582-3
38. Kahan BD, Keown P, Levy GA, Johnston A. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clin Therapeut.* (2002) 24:330–50. doi: 10.1016/S0149-2918(02)85038-X
39. Land W, Schleibner S, Schneeberger H, Schilling M. current immunosuppressive strategies in kidney transplantation. In: Munro I, editor. *Contributions to Nephrology.* (London) S. Karger AG (1990). p. 146–64; discussion 62–4.
40. Calne RY, Rolles K, Thiru S, McMaster P, Craddock GN, Aziz S, et al. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet.* (1979) 314:1033–6. doi: 10.1016/S0140-6736(79)92440-1
41. Behrouz NC, Wenger CD, Mathison BA. Prophylactic treatment of BALB/c mice with cyclosporine A and its analog B-5–49 enhances resistance to *Leishmania major*. *J Immunol.* (1986) 136:3067–75.
42. Olsson R, Remberger M, Hassan Z, Omazic B, Mattsson J, Ringdén O. GVHD prophylaxis using low-dose cyclosporine improves survival in leukaemic recipients of HLA-identical sibling transplants. *Eur J Haematol.* (2010) 84:323–31. doi: 10.1111/j.1600-0609.2009.01390.x
43. Ross HJ, Cho J, Osann K, Wong S-F, Ramsinghani N, Williams J, et al. Phase I/II trial of low dose cyclosporin A with EP for advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* (1997) 18:189–98. doi: 10.1016/S0169-5002(97)00061-5
44. Bretscher PA, Havele C. Cyclosporin A can switch the immune response induced by antigen from a humoral to a cell-mediated mode. *Eur J Immunol.* (1992) 22:349–55. doi: 10.1002/eji.1830220210
45. Miroux C, Morales O, Carpentier A, Dharancy S, Conti F, Boleslowski E, et al. Inhibitory effects of cyclosporine on human regulatory T cells *in vitro*. *Transplant Proceed.* (2009) 41:3371–4. doi: 10.1016/j.transproceed.2009.08.043
46. López-Flores R, Bojalil R, Benítez JC, Ledesma-Soto Y, Terrazas CA, Rodríguez-Sosa M, et al. Consecutive low doses of cyclosporine A induce pro-inflammatory cytokines and accelerate allograft skin rejection. *Molecules.* (2011) 16:3969–84. doi: 10.3390/molecules16053969
47. Mustafa M, Diener P, Sun JB, Link H, Olsson T. Immunopharmacologic modulation of experimental allergic encephalomyelitis: low-dose cyclosporin-A treatment causes disease relapse and increased systemic T and B cell-mediated myelin-directed autoimmunity. *Scandinav J Immunol.* (1993) 38:499–507. doi: 10.1111/j.1365-3083.1993.tb03232.x
48. Storb R, Deeg HJ, Fisher L, Appelbaum F, Buckner CD, Bensinger W, et al. Cyclosporine v methotrexate for graft-v-host disease prevention in patients given marrow grafts for leukemia: long-term follow-up of three controlled trials. *Blood.* (1988) 71:293–8.
49. Bacigalupo A, Van Lint MT, Occhini D, Gualandi F, Lamparelli T, Sogno G, et al. Increased risk of leukemia relapse with high-dose cyclosporine A after allogeneic marrow transplantation for acute leukemia. *Blood.* (1991) 77:1423–8.
50. Vaeth M, Bauerlein CA, Pusch T, Findeis J, Chopra M, Mottok A, et al. Selective NFAT targeting in T cells ameliorates GVHD while maintaining antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2015) 112:1125–30. doi: 10.1073/pnas.1409290112
51. Buchholz M, Schatz A, Wagner M, Michl P, Linhart T, Adler G, et al. Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *EMBO J.* (2006) 25:3714–24. doi: 10.1038/sj.emboj.7601246
52. Chen ZL, Zhao SH, Wang Z, Qiu B, Li BZ, Zhou F, et al. Expression and unique functions of four nuclear factor of activated T cells isoforms in non-small cell lung cancer. *Chin J Cancer.* (2011) 30:62–8. doi: 10.5732/cjc.010.10156
53. Wang S, Kang X, Cao S, Cheng H, Wang D, Geng J. Calcineurin/NFATc1 pathway contributes to cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *Digest Dis Sci.* (2012) 57:3184–8. doi: 10.1007/s10620-012-2255-8
54. Robbs BK, Cruz AL, Werneck MB, Mogno GP, Viola JP. Dual roles for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors. *Mol Cell Biol.* (2008) 28:7168–81. doi: 10.1128/MCB.00256-08
55. Flockhart RJ, Armstrong JL, Reynolds NJ, Lovat PE. NFAT signalling is a novel target of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *Br J Cancer.* (2009) 101:1448–55. doi: 10.1038/sj.bjc.6605277
56. Seifert A, Rau S, Kullertz G, Fischer B, Santos AN. TCDD induces cell migration via NFATc1/ATX-signaling in MCF-7 cells. *Toxicol Lett.* (2009) 184:26–32. doi: 10.1016/j.toxlet.2008.10.026
57. Kulkarni RM, Greenberg JM, Akeson AL. NFATc1 regulates lymphatic endothelial development. *Mech Dev.* (2009) 126(5–6):350–65. doi: 10.1016/j.mod.2009.02.003
58. Kawahara T, Kashiwagi E, Li Y, Zheng Y, Miyamoto Y, Netto GJ, et al. Cyclosporine A and tacrolimus inhibit urothelial tumorigenesis. *Mol Carcinog.* (2016) 55:161–9. doi: 10.1002/mc.22265
59. Kawahara T, Kashiwagi E, Ide H, Li Y, Zheng Y, Ishiguro H, et al. The role of NFATc1 in prostate cancer progression: cyclosporine A and tacrolimus inhibit cell proliferation, migration, and invasion. *Prostate.* (2015) 75:573–84. doi: 10.1002/pros.22937
60. Werneck MBF, Hottz E, Bozza PT, Viola JPB. Cyclosporin A inhibits colon cancer cell growth independently of the calcineurin pathway. *Cell Cycle.* (2012) 11:3997–4008. doi: 10.4161/cc.22222

61. Masuo T, Okamura S, Zhang Y, Mori M. Cyclosporine A inhibits colorectal cancer proliferation probably by regulating expression levels of c-Myc, p21(WAF1/CIP1) and proliferating cell nuclear antigen. *Cancer Lett.* (2009) 285:66–72. doi: 10.1016/j.canlet.2009.05.001
62. Xing XL, Lu Y, Qiu HL. Effect of cyclosporin A particles of varying diameters on gastric cancer cell apoptosis. *Genet Mol Res.* (2016) 15:1–8. doi: 10.4238/gmr.15028085
63. Gao L, Dong J, Zhang N, Le Z, Ren W, Li S, et al. Cyclosporine A suppresses the malignant progression of oral squamous cell carcinoma *in vitro*. *Anti Cancer Agent Med Chem.* (2019). doi: 10.2174/1871520618666181029170605. [Epub ahead of print].
64. Koury LC, Figueiredo-Pontes LL, Simoes BP, Oliveira LC, Dalmazzo LF, Tostes Pintão MC, et al. The use of cyclosporine in association with chemotherapy as induction treatment in patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) and high rhodamine efflux at diagnosis results in higher complete hematological remission rates, but does not prolong overall survival. *Blood.* (2015) 126:4896.
65. Cooper DL, Braverman IM, Sarris AH, Durivage HJ, Saidman BH, Davis CA, et al. Cyclosporine treatment of refractory T-cell lymphomas. *Cancer.* (1993) 71:2335–41.
66. Isshiki Y, Tanaka H, Suzuki Y, Yoshida Y. Cyclosporine is a potential curative treatment option for advanced thymoma. *Exp Hematol Oncol.* (2017) 6:13. doi: 10.1186/s40164-017-0073-6
67. Brandt C, Pavlovic V, Radbruch A, Worm M, Baumgrass R. Low-dose cyclosporine A therapy increases the regulatory T cell population in patients with atopic dermatitis. *Allergy.* (2009) 64:1588–96. doi: 10.1111/j.1398-9995.2009.02054.x
68. Hijnen D, Haeck I, van Kraats AA, Nijhuis E, de Bruin-Weller MS, Bruijnzeel-Koomen CA, et al. Cyclosporin A reduces CD4(+)CD25(+) regulatory T-cell numbers in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* (2009) 124:856–8. doi: 10.1016/j.jaci.2009.07.056
69. Filantenkov A, Schmidt H, Reutzel-Selke A, Seifert M, Doebeis C, Jurisch A, et al. Initial organ engraftment with a short-term low-dose CyA treatment induces tolerance for consecutive grafts in a model of strong histoincompatibility. *Transplant Proc.* (2002) 34:2895–6. doi: 10.1016/S0041-1345(02)03551-0
70. Wang H, Zhao L, Sun Z, Sun L, Zhang B, Zhao Y. A potential side effect of cyclosporin A: inhibition of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in mice. *Transplantation.* (2006) 82:1484–92. doi: 10.1097/01.tp.0000246312.89689.17
71. Whiteside TL. FOXP3+ Treg as a therapeutic target for promoting anti-tumor immunity. Expert opinion on therapeutic targets. (2018) 22:353–63. doi: 10.1080/14728222.2018.1451514

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Flores, Fouquet, Moura, Maciel and Hermine. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

X. Références bibliographiques

A

Ahmad, K. A., J. R. Ahmann, M. C. Migas, A. Waheed, R. S. Britton, B. R. Bacon, W. S. Sly and R. E. Fleming (2002). "Decreased liver hepcidin expression in the Hfe knockout mouse." Blood Cells Mol Dis **29**(3): 361-366.

Aisen, P., A. Leibman and J. Zweier (1978). "Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin." J Biol Chem **253**(6): 1930-1937.

Alekel, D. L., A. S. Germain, C. T. Peterson, K. B. Hanson, J. W. Stewart and T. Toda (2000). "Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women." Am J Clin Nutr **72**(3): 844-852.

An, X., V. P. Schulz, J. Li, K. Wu, J. Liu, F. Xue, J. Hu, N. Mohandas and P. G. Gallagher (2014). "Global transcriptome analyses of human and murine terminal erythroid differentiation." Blood **123**(22): 3466-3477.

Arcasoy, M. O. and X. Jiang (2005). "Co-operative signalling mechanisms required for erythroid precursor expansion in response to erythropoietin and stem cell factor." Br J Haematol **130**(1): 121-129.

Ardehali, R., L. Shi, J. Janatova, S. F. Mohammad and G. L. Burns (2003). "The inhibitory activity of serum to prevent bacterial adhesion is mainly due to apo-transferrin." J Biomed Mater Res A **66**(1): 21-28.

Artuso, I., M. R. Lidonnici, S. Altamura, G. Mandelli, M. Pettinato, M. U. Muckenthaler, L. Silvestri, G. Ferrari, C. Camaschella and A. Nai (2018). "Transferrin receptor 2 is a potential novel therapeutic target for beta-thalassemia: evidence from a murine model." Blood **132**(21): 2286-2297.

Asano, J., K. Chiba, M. Tada and T. Yoshii (1996). "Cytotoxic xanones from *Garcinia hanburyi*." Phytochemistry **41**(3): 815-820.

Aschemeyer, S., B. Qiao, D. Stefanova, E. V. Valore, A. C. Sek, T. A. Ruwe, K. R. Vieth, G. Jung, C. Casu, S. Rivella, M. Jormakka, B. Mackenzie, T. Ganz and E. Nemeth (2018). "Structure-function analysis of ferroportin defines the binding site and an alternative mechanism of action of hepcidin." Blood **131**(8): 899-910.

Asselin-Labat, M. L., F. Vaillant, J. M. Sheridan, B. Pal, D. Wu, E. R. Simpson, H. Yasuda, G. K. Smyth, T. J. Martin, G. J. Lindeman and J. E. Visvader (2010). "Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling." Nature **465**(7299): 798-802.

Auer, P. L., A. Teumer, U. Schick, A. O'Shaughnessy, K. S. Lo, N. Chami, C. Carlson, S. de Denu, M. P. Dube, J. Haessler, R. D. Jackson, C. Kooperberg, L. P. Perreault, M. Nauck, U. Peters, J. D. Rioux, F. Schmidt, V. Turcot, U. Volker, H. Volzke, A. Greinacher, L. Hsu, J. C. Tardif, G. A. Diaz, A. P. Reiner and G. Lettre (2014). "Rare and low-frequency coding variants in CXCR2 and other genes are associated with hematological traits." Nat Genet **46**(6): 629-634.

Auerbach, M., H. Ballard, J. R. Trout, M. McIlwain, A. Ackerman, H. Bahrain, S. Balan, L. Barker and J. Rana (2004). "Intravenous iron optimizes the response to recombinant human erythropoietin in cancer patients with chemotherapy-related anemia: a multicenter, open-label, randomized trial." J Clin Oncol **22**(7): 1301-1307.

B

Barrientos, T., I. Laouamatas, T. R. Koves, E. J. Soderblom, M. Bryan, M. A. Moseley, D. M. Muoio and N. C. Andrews (2015). "Metabolic Catastrophe in Mice Lacking Transferrin Receptor in Muscle." EBioMedicine **2**(11): 1705-1717.

Batista, A., J. Millan, M. Mittelbrunn, F. Sanchez-Madrid and M. A. Alonso (2004). "Recruitment of transferrin receptor to immunological synapse in response to TCR engagement." J Immunol **172**(11): 6709-6714.

Bauer, A., W. Mikulits, G. Lagger, G. Stengl, G. Brosch and H. Beug (1998). "The thyroid hormone receptor functions as a ligand-operated developmental switch between proliferation and differentiation of erythroid progenitors." Embo j **17**(15): 4291-4303.

Baynes, R. D., Y. J. Shih and J. D. Cook (1994). "Mechanism of production of the serum transferrin receptor." Adv Exp Med Biol **356**: 61-68.

Beadling, C., K. W. Johnson and K. A. Smith (1993). "Isolation of interleukin 2-induced immediate-early genes." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(7): 2719-2723.

- Beguín, Y. (2003). "Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status." Clin Chim Acta **329**(1-2): 9-22.
- Beneduce, E., A. Matte, L. De Falco, S. Mbiandjeu, D. Chiabrando, E. Tolosano, E. Federti, S. Petrillo, N. Mohandas, A. Siciliano, W. Babu, V. Menon, S. Ghaffari, A. Iolascon and L. De Franceschi (2019). "Fyn kinase is a novel modulator of erythropoietin signaling and stress erythropoiesis." Am J Hematol **94**(1): 10-20.
- Bennett, M. J., J. A. Lebron and P. J. Bjorkman (2000). "Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor." Nature **403**(6765): 46-53.
- Besarab, A. and C. L. Dalton (2001). "Maintaining higher TSATs and other iron indices is beneficial in management of anemic hemodialysis patients." Nephrol Nurs J **28**(4): 429-434.
- Bhukhai, K., K. Suksen, N. Bhummaphan, K. Janjorn, N. Thongon, D. Tantikanlayaporn, P. Piyachaturawat, A. Suksamrarn and A. Chairoungdua (2012). "A phytoestrogen diarylheptanoid mediates estrogen receptor/Akt/glycogen synthase kinase 3 β protein-dependent activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway." J Biol Chem **287**(43): 36168-36178.
- Blobel, G. A. and S. H. Orkin (1996). "Estrogen-induced apoptosis by inhibition of the erythroid transcription factor GATA-1." Mol Cell Biol **16**(4): 1687-1694.
- Blobel, G. A., C. A. Sieff and S. H. Orkin (1995). "Ligand-dependent repression of the erythroid transcription factor GATA-1 by the estrogen receptor." Mol Cell Biol **15**(6): 3147-3153.
- Bord, S., S. Vedi, S. R. Beavan, A. Horner and J. E. Compston (2000). "Megakaryocyte population in human bone marrow increases with estrogen treatment: a role in bone remodeling?" Bone **27**(3): 397-401.
- Bouscary, D., C. Lecoq-Lafon, S. Chretien, S. Zompi, S. Fichelson, O. Muller, F. Porteu, I. Dusanter-Fourt, S. Gisselbrecht, P. Mayeux and C. Lacombe (2001). "Role of Gab proteins in phosphatidylinositol 3-kinase activation by thrombopoietin (Tpo)." Oncogene **20**(18): 2197-2204.
- Bouscary, D., F. Pene, Y. E. Claessens, O. Muller, S. Chretien, M. Fontenay-Roupie, S. Gisselbrecht, P. Mayeux and C. Lacombe (2003). "Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation." Blood **101**(9): 3436-3443.
- Broudy, V. C., N. L. Lin, H. J. Buhring, N. Komatsu and T. J. Kavanagh (1998). "Analysis of c-kit receptor dimerization by fluorescence resonance energy transfer." Blood **91**(3): 898-906.
- Broxmeyer, H. E., D. E. Williams, K. Geissler, G. Hangoc, S. Cooper, D. C. Bicknell, S. Levi and P. Arosio (1989). "Suppressive effects in vivo of purified recombinant human H-subunit (acidic) ferritin on murine myelopoiesis." Blood **73**(1): 74-79.
- Brugnara, C., L. A. Chambers, E. Malynn, M. A. Goldberg and M. S. Kruskall (1993). "Red blood cell regeneration induced by subcutaneous recombinant erythropoietin: iron-deficient erythropoiesis in iron-replete subjects." Blood **81**(4): 956-964.
- Butterworth, M., B. McClellan and M. Allansmith (1967). "Influence of sex in immunoglobulin levels." Nature **214**(5094): 1224-1225.

C

- Calvanese, V., L. K. Lee and H. K. Mikkola (2014). "Sex hormone drives blood stem cell reproduction." Embo j **33**(6): 534-535.
- Calzolari, A., I. Oliviero, S. Deaglio, G. Mariani, M. Biffoni, N. M. Sposi, F. Malavasi, C. Peschle and U. Testa (2007). "Transferrin receptor 2 is frequently expressed in human cancer cell lines." Blood Cells Mol Dis **39**(1): 82-91.
- Calzolari, A., C. Raggi, S. Deaglio, N. M. Sposi, M. Stafsnes, K. Fecchi, I. Parolini, F. Malavasi, C. Peschle, M. Sargiacomo and U. Testa (2006). "TfR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway." J Cell Sci **119**(Pt 21): 4486-4498.
- Camaschella, C., A. Roetto, A. Cali, M. De Gobbi, G. Garozzo, M. Carella, N. Majorano, A. Totaro and P. Gasparini (2000). "The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22." Nat Genet **25**(1): 14-15.
- Cancelo-Hidalgo, M. J., C. Castelo-Branco, S. Palacios, J. Haya-Palazuelos, M. Ciria-Recasens, J. Manasanch and L. Perez-Edo (2013). "Tolerability of different oral iron supplements: a systematic review." Curr Med Res Opin **29**(4): 291-303.
- Cano, E., A. Pizarro, J. M. Redondo, F. Sanchez-Madrid, C. Bernabeu and M. Fresno (1990). "Induction of T cell activation by monoclonal antibodies specific for the transferrin receptor." Eur J Immunol **20**(4): 765-770.

- Cao, H., J. Chen, E. W. Krueger and M. A. McNiven (2010). "SRC-mediated phosphorylation of dynamin and cortactin regulates the "constitutive" endocytosis of transferrin." Mol Cell Biol **30**(3): 781-792.
- Carmeci, C., D. A. Thompson, H. Z. Ring, U. Francke and R. J. Weigel (1997). "Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer." Genomics **45**(3): 607-617.
- Carreras, E. and S. Kovats (2014). "Girl power: estrogen promotes HSC self-renewal." Cell Stem Cell **14**(2): 137-138.
- Carreras, E., S. Turner, V. Paharkova-Vatchkova, A. Mao, C. Dascher and S. Kovats (2008). "Estradiol acts directly on bone marrow myeloid progenitors to differentially regulate GM-CSF or Flt3 ligand-mediated dendritic cell differentiation." J Immunol **180**(2): 727-738.
- Charoenwanthanang, P., S. Lawanprasert, L. Phivthong-Ngam, P. Piyachaturawat, Y. Sanvarinda and S. Porntadavity (2011). "Effects of Curcuma comosa on the expression of atherosclerosis-related cytokine genes in rabbits fed a high-cholesterol diet." J Ethnopharmacol **134**(3): 608-613.
- Chen, A. C., A. Donovan, R. Ned-Sykes and N. C. Andrews (2015). "Noncanonical role of transferrin receptor 1 is essential for intestinal homeostasis." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(37): 11714-11719.
- Chen, J., M. Chloupkova, J. Gao, T. L. Chapman-Arvedson and C. A. Enns (2007). "HFE modulates transferrin receptor 2 levels in hepatoma cells via interactions that differ from transferrin receptor 1-HFE interactions." J Biol Chem **282**(51): 36862-36870.
- Chen, J. and C. A. Enns (2012). "Hereditary hemochromatosis and transferrin receptor 2." Biochim Biophys Acta **1820**(3): 256-263.
- Chen, J. and C. A. Enns (2015). "CD81 promotes both the degradation of transferrin receptor 2 (TfR2) and the Tfr2-mediated maintenance of hepcidin expression." J Biol Chem **290**(12): 7841-7850.
- Cheng, Y., O. Zak, P. Aisen, S. C. Harrison and T. Walz (2004). "Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex." Cell **116**(4): 565-576.
- Chin, H., A. Arai, H. Wakao, R. Kamiyama, N. Miyasaka and O. Miura (1998). "Lyn physically associates with the erythropoietin receptor and may play a role in activation of the Stat5 pathway." Blood **91**(10): 3734-3745.
- Chrubasik, S., M. H. Pittler and B. D. Roufogalis (2005). "Zingiberis rhizoma: a comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles." Phytomedicine **12**(9): 684-701.
- Ciechanover, A., A. L. Schwartz, A. Dautry-Varsat and H. F. Lodish (1983). "Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. Effect of lysosomotropic agents." J Biol Chem **258**(16): 9681-9689.
- Clemons, M. and P. Goss (2001). "Estrogen and the risk of breast cancer." N Engl J Med **344**(4): 276-285.
- Cole, J., D. Ertoy, H. Lin, R. L. Sutliff, E. Ezan, T. T. Guyene, M. Capecchi, P. Corvol and K. E. Bernstein (2000). "Lack of angiotensin II-facilitated erythropoiesis causes anemia in angiotensin-converting enzyme-deficient mice." J Clin Invest **106**(11): 1391-1398.
- Collawn, J. F., M. Stangel, L. A. Kuhn, V. Esekogwu, S. Q. Jing, I. S. Trowbridge and J. A. Tainer (1990). "Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis." Cell **63**(5): 1061-1072.
- Conway, A. J., F. C. Brown, G. Rank, B. T. Kile, C. J. Morton, S. M. Jane and D. J. Curtis (2018). "Characterization of Tfrc-mutant mice with microcytic phenotypes." Blood Adv **2**(15): 1914-1922.
- Corradini, E., M. Rozier, D. Meynard, A. Odhiambo, H. Y. Lin, Q. Feng, M. C. Migas, R. S. Britton, J. L. Babitt and R. E. Fleming (2011). "Iron regulation of hepcidin despite attenuated Smad1,5,8 signaling in mice without transferrin receptor 2 or Hfe." Gastroenterology **141**(5): 1907-1914.
- Cos, P., T. De Bruyne, S. Apers, D. Vanden Berghe, L. Pieters and A. J. Vlietinck (2003). "Phytoestrogens: recent developments." Planta Med **69**(7): 589-599.
- Coulon, S., M. Dussiot, D. Grapton, T. T. Maciel, P. H. Wang, C. Callens, M. K. Tiwari, S. Agarwal, A. Fricot, J. Vandekerckhove, H. Tamouza, Y. Zermati, J. A. Ribeil, K. Djedaini, Z. Oruc, V. Pascal, G. Courtois, B. Arnulf, M. A. Alyanakian, P. Mayeux, T. Leanderson, M. Benhamou, M.

Cogne, R. C. Monteiro, O. Hermine and I. C. Moura (2011). "Polymeric IgA1 controls erythroblast proliferation and accelerates erythropoiesis recovery in anemia." Nat Med **17**(11): 1456-1465.

Courtois, G., J. Vandekerckhove, M. Dussiot, J. Kersual, S. Coulon, Z. Belaid, Y. Zermati, J.-A. Ribeil and O. Hermine (2007). "L'érythropoïèse tardive : une mort avortée ?" Hématologie **13**(6):400-408.

Couse, J. F. and K. S. Korach (1999). "Reproductive phenotypes in the estrogen receptor-alpha knockout mouse." Ann Endocrinol (Paris) **60**(2): 143-148.

D

D'Alessio, F., M. W. Hentze and M. U. Muckenthaler (2012). "The hemochromatosis proteins HFE, TfR2, and HJV form a membrane-associated protein complex for hepcidin regulation." J Hepatol **57**(5): 1052-1060.

D'Andrea, A. D., H. F. Lodish and G. G. Wong (1989). "Expression cloning of the murine erythropoietin receptor." Cell **57**(2): 277-285.

Dai, J., J. Jian, M. Bosland, K. Frenkel, G. Bernhardt and X. Huang (2008). "Roles of hormone replacement therapy and iron in proliferation of breast epithelial cells with different estrogen and progesterone receptor status." Breast **17**(2): 172-179.

Dai, Z., Y. Li, L. D. Quarles, T. Song, W. Pan, H. Zhou and Z. Xiao (2007). "Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation." Phytomedicine **14**(12): 806-814.

De Domenico, I., D. McVey Ward and J. Kaplan (2008). "Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 72-81.

De Maria, R., U. Testa, L. Luchetti, A. Zeuner, G. Stassi, E. Pelosi, R. Riccioni, N. Felli, P. Samoggia and C. Peschle (1999). "Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis." Blood **93**(3): 796-803.

Deaglio, S., A. Capobianco, A. Cali, F. Bellora, F. Alberti, L. Righi, A. Sapino, C. Camaschella and F. Malavasi (2002). "Structural, functional, and tissue distribution analysis of human transferrin receptor-2 by murine monoclonal antibodies and a polyclonal antiserum." Blood **100**(10): 3782-3789.

Delfosse, V., M. Grimaldi, V. Cavaillès, P. Balaguer and W. Bourguet (2014). "Structural and functional profiling of environmental ligands for estrogen receptors." Environ Health Perspect **122**(12): 1306-1313.

Desmawati, D. and D. Sulastri (2019). "Phytoestrogens and Their Health Effect." Open Access Maced J Med Sci **7**(3): 495-499.

Di Guglielmo, G. M., C. Le Roy, A. F. Goodfellow and J. L. Wrana (2003). "Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover." Nat Cell Biol **5**(5): 410-421.

Dukes, P. P. and E. Goldwasser (1961). "Inhibition of erythropoiesis by estrogens." Endocrinology **69**: 21-29.

Dutertre, M. and C. L. Smith (2000). "Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator (SERM) action." J Pharmacol Exp Ther **295**(2): 431-437.

E

Erlandsson, M. C., C. A. Jonsson, M. K. Lindberg, C. Ohlsson and H. Carlsten (2002). "Raloxifene- and estradiol-mediated effects on uterus, bone and B lymphocytes in mice." J Endocrinol **175**(2): 319-327.

Estey, E. H. (2001). "Growth factors in acute myeloid leukaemia." Best Pract Res Clin Haematol **14**(1): 175-187.

F

Fan, J. Z., L. Yang, G. L. Meng, Y. S. Lin, B. Y. Wei, J. Fan, H. M. Hu, Y. W. Liu, S. Chen, J. K. Zhang, Q. Z. He, Z. J. Luo and J. Liu (2014). "Estrogen improves the proliferation and differentiation of hBMSCs derived from postmenopausal osteoporosis through notch signaling pathway." Mol Cell Biochem **392**(1-2): 85-93.

Fillebeen, C., E. Charlebois, J. Wagner, A. Katsarou, J. Mui, H. Vali, D. Garcia-Santos, P. Ponka, J. Presley and K. Pantopoulos (2019). "Transferrin receptor 1 controls systemic iron homeostasis by fine-tuning hepcidin expression to hepatocellular iron load." Blood **133**(4): 344-355.

Fish, E. N. (2008). "The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses." Nat Rev Immunol **8**(9): 737-744.

Fishbane, S., G. L. Frei and J. Maesaka (1995). "Reduction in recombinant human erythropoietin doses by the use of chronic intravenous iron supplementation." Am J Kidney Dis **26**(1): 41-46.

Fleming, R. E., J. R. Ahmann, M. C. Migas, A. Waheed, H. P. Koeffler, H. Kawabata, R. S. Britton, B. R. Bacon and W. S. Sly (2002). "Targeted mutagenesis of the murine transferrin receptor-2 gene produces hemochromatosis." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10653-10658.

Fleming, R. E., M. C. Migas, C. C. Holden, A. Waheed, R. S. Britton, S. Tomatsu, B. R. Bacon and W. S. Sly (2000). "Transferrin receptor 2: continued expression in mouse liver in the face of iron overload and in hereditary hemochromatosis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(5): 2214-2219.

Folkerd, E. J. and M. Dowsett (2010). "Influence of sex hormones on cancer progression." J Clin Oncol **28**(26): 4038-4044.

Forejtnikova, H., M. Vieillevoys, Y. Zermati, M. Lambert, R. M. Pellegrino, S. Guihard, M. Gaudry, C. Camaschella, C. Lacombe, A. Roetto, P. Mayeux and F. Verdier (2010). "Transferrin receptor 2 is a component of the erythropoietin receptor complex and is required for efficient erythropoiesis." Blood **116**(24): 5357-5367.

Fritz, W. A., L. Coward, J. Wang and C. A. Lamartiniere (1998). "Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat." Carcinogenesis **19**(12): 2151-2158.

Fruman, D. A., F. Mauvais-Jarvis, D. A. Pollard, C. M. Yballe, D. Brazil, R. T. Bronson, C. R. Kahn and L. C. Cantley (2000). "Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha." Nat Genet **26**(3): 379-382.

G

Gao, B., Q. Huang, Q. Jie, L. Wang, H. Y. Zhang, J. Liu, L. Yang and Z. J. Luo (2015). "Dose-response estrogen promotes osteogenic differentiation via GPR40 (FFAR1) in murine BMMSCs." Biochimie **110**: 36-44.

Gao, J., J. Chen, M. Kramer, H. Tsukamoto, A. S. Zhang and C. A. Enns (2009). "Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression." Cell Metab **9**(3): 217-227.

Garcon, L., C. Rivat, C. James, C. Lacout, V. Camara-Clayette, V. Ugo, Y. Lecluse, A. Bennaceur-Griscelli and W. Vainchenker (2006). "Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells." Blood **108**(5): 1551-1554.

Ghazeeri, G., L. Abdullah and O. Abbas (2011). "Immunological differences in women compared with men: overview and contributing factors." Am J Reprod Immunol **66**(3): 163-169.

Giannetti, A. M. and P. J. Bjorkman (2004). "HFE and transferrin directly compete for transferrin receptor in solution and at the cell surface." J Biol Chem **279**(24): 25866-25875.

Giannetti, A. M., P. M. Snow, O. Zak and P. J. Bjorkman (2003). "Mechanism for multiple ligand recognition by the human transferrin receptor." PLoS Biol **1**(3): E51.

Ginzburg, Y. Z., A. C. Rybicki, S. M. Suzuka, C. B. Hall, W. Breuer, Z. I. Cabantchik, E. E. Bouhassira, M. E. Fabry and R. L. Nagel (2009). "Exogenous iron increases hemoglobin in beta-thalassemic mice." Exp Hematol **37**(2): 172-183.

Girelli, D., S. Ugolini, F. Busti, G. Marchi and A. Castagna (2018). "Modern iron replacement therapy: clinical and pathophysiological insights." Int J Hematol **107**(1): 16-30.

Goldwasser, E. (1984). "Erythropoietin and its mode of action." Blood Cells **10**(2-3): 147-162.

Goldwasser, E., S. B. Krantz and F. F. Wang (1984). "Erythropoietin and erythroid differentiation." Symp Fundam Cancer Res **37**: 103-107.

Gomme, P. T., K. B. McCann and J. Bertolini (2005). "Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions." Drug Discov Today **10**(4): 267-273.

Goodnough, L. T., B. Skikne and C. Brugnara (2000). "Erythropoietin, iron, and erythropoiesis." Blood **96**(3): 823-833.

Gooren, L. J. and A. W. Toorians (2003). "Significance of oestrogens in male (patho)physiology." Ann Endocrinol (Paris) **64**(2): 126-135.

Gourdy, P., L. M. Araujo, R. Zhu, B. Garmy-Susini, S. Diem, H. Laurell, M. Leite-de-Moraes, M. Dy, J. F. Arnal, F. Bayard and A. Herbelin (2005). "Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol promotes IFN-gamma production by invariant natural killer T cells." Blood **105**(6): 2415-2420.

- Gray, C. P., P. Arosio and P. Hersey (2002). "Heavy chain ferritin activates regulatory T cells by induction of changes in dendritic cells." Blood **99**(9): 3326-3334.
- Grebien, F., M. A. Kerenyi, B. Kovacic, T. Kolbe, V. Becker, H. Dolznig, K. Pfeffer, U. Klingmuller, M. Muller, H. Beug, E. W. Mullner and R. Moriggl (2008). "Stat5 activation enables erythropoiesis in the absence of EpoR and Jak2." Blood **111**(9): 4511-4522.
- Grimaldi, C. M., D. J. Michael and B. Diamond (2001). "Cutting edge: expansion and activation of a population of autoreactive marginal zone B cells in a model of estrogen-induced lupus." J Immunol **167**(4): 1886-1890.
- Gruber, C. J., W. Tschugguel, C. Schneeberger and J. C. Huber (2002). "Production and actions of estrogens." N Engl J Med **346**(5): 340-352.
- Gruber, M., C. J. Hu, R. S. Johnson, E. J. Brown, B. Keith and M. C. Simon (2007). "Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(7): 2301-2306.
- Gruszczyk, J. and U. Kanjee (2018). "Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for Plasmodium vivax." **359**(6371): 48-55.
- Gutierrez, L., S. Tsukamoto, M. Suzuki, H. Yamamoto-Mukai, M. Yamamoto, S. Philipsen and K. Ohneda (2008). "Ablation of Gata1 in adult mice results in aplastic crisis, revealing its essential role in steady-state and stress erythropoiesis." Blood **111**(8): 4375-4385.

H

- Halupa, A., M. L. Bailey, K. Huang, N. N. Iscove, D. E. Levy and D. L. Barber (2005). "A novel role for STAT1 in regulating murine erythropoiesis: deletion of STAT1 results in overall reduction of erythroid progenitors and alters their distribution." Blood **105**(2): 552-561.
- Hartung, A., K. Bitton-Worms, M. M. Rechtman, V. Wenzel, J. H. Boergermann, S. Hassel, Y. I. Henis and P. Knaus (2006). "Different routes of bone morphogenic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling." Mol Cell Biol **26**(20): 7791-7805.
- Haseyama, Y., K. Sawada, A. Oda, K. Koizumi, H. Takano, T. Tarumi, M. Nishio, M. Handa, Y. Ikeda and T. Koike (1999). "Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the protection of primary cultured human erythroid precursor cells from apoptosis." Blood **94**(5): 1568-1577.
- Heidel, F. H., B. G. Mar and S. A. Armstrong (2011). "Self-renewal related signaling in myeloid leukemia stem cells." Int J Hematol **94**(2): 109-117.
- Heldring, N., A. Pike, S. Andersson, J. Matthews, G. Cheng, J. Hartman, M. Tujague, A. Strom, E. Treuter, M. Warner and J. A. Gustafsson (2007). "Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets." Physiol Rev **87**(3): 905-931.
- Hermine, O., P. Mayeux, M. Titeux, M. T. Mitjavila, N. Casadevall, J. Guichard, N. Komatsu, T. Suda, Y. Miura, W. Vainchenker and et al. (1992). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and erythropoietin act competitively to induce two different programs of differentiation in the human pluripotent cell line UT-7." Blood **80**(12): 3060-3069.
- Hilton, D. J., S. S. Watowich, P. J. Murray and H. F. Lodish (1995). "Increased cell surface expression and enhanced folding in the endoplasmic reticulum of a mutant erythropoietin receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(1): 190-194.
- Hirschler-Laszkiewicz, I., Q. Tong, K. Conrad, W. Zhang, W. W. Flint, A. J. Barber, D. L. Barber, J. Y. Cheung and B. A. Miller (2009). "TRPC3 activation by erythropoietin is modulated by TRPC6." J Biol Chem **284**(7): 4567-4581.
- Hodges, V. M., S. Rainey, T. R. Lappin and A. P. Maxwell (2007). "Pathophysiology of anemia and erythrocytosis." Crit Rev Oncol Hematol **64**(2): 139-158.
- Huang, L. J., S. N. Constantinescu and H. F. Lodish (2001). "The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor." Mol Cell **8**(6): 1327-1338.
- Huddleston, H., B. Tan, F. C. Yang, H. White, M. J. Wenning, A. Orazi, M. C. Yoder, R. Kapur and D. A. Ingram (2003). "Functional p85alpha gene is required for normal murine fetal erythropoiesis." Blood **102**(1): 142-145.
- Hwang, J., H. N. Hodis and A. Sevanian (2001). "Soy and alfalfa phytoestrogen extracts become potent low-density lipoprotein antioxidants in the presence of acerola cherry extract." J Agric Food Chem **49**(1): 308-314.

I

Idzerda, R. L., H. Huebers, C. A. Finch and G. S. McKnight (1986). "Rat transferrin gene expression: tissue-specific regulation by iron deficiency." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(11): 3723-3727.

Igarashi, H., T. Kouro, T. Yokota, P. C. Comp and P. W. Kincade (2001). "Age and stage dependency of estrogen receptor expression by lymphocyte precursors." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15131-15136.

Illing, A., P. Liu, S. Ostermay, A. Schilling, G. de Haan, A. Krust, M. Amling, P. Chambon, T. Schinke and J. P. Tuckermann (2012). "Estradiol increases hematopoietic stem and progenitor cells independent of its actions on bone." Haematologica **97**(8): 1131-1135.

Imai, Y., M. Y. Youn, S. Kondoh, T. Nakamura, A. Kouzmenko, T. Matsumoto, I. Takada, K. Takaoka and S. Kato (2009). "Estrogens maintain bone mass by regulating expression of genes controlling function and life span in mature osteoclasts." Ann N Y Acad Sci **1173 Suppl 1**: E31-39.

Intapad, S., V. Saengsirisuwan, M. Prasannarong, A. Chuncharunee, W. Suvitayawat, R. Chokchaisiri, A. Suksamrarn and P. Piyachaturawat (2012). "Long-term effect of phytoestrogens from *Curcuma comosa* Roxb. on vascular relaxation in ovariectomized rats." J Agric Food Chem **60**(3): 758-764.

Intapad, S., A. Suksamrarn and P. Piyachaturawat (2009). "Enhancement of vascular relaxation in rat aorta by phytoestrogens from *Curcuma comosa* Roxb." Vascul Pharmacol **51**(4): 284-290.

Ishibashi, T., J. A. Koziol and S. A. Burstein (1987). "Human recombinant erythropoietin promotes differentiation of murine megakaryocytes in vitro." J Clin Invest **79**(1): 286-289.

J

Jabara, H. H., S. E. Boyden, J. Chou, N. Ramesh, M. J. Massaad, H. Benson, W. Bainter, D. Fraulino, F. Rahimov, C. Sieff, Z. J. Liu, S. H. Alshemmari, B. K. Al-Ramadi, H. Al-Dhekri, R. Arnaout, M. Abu-Shukair, A. Vatsayan, E. Silver, S. Ahuja, E. G. Davies, M. Sola-Visner, T. K. Ohsumi, N. C. Andrews, L. D. Notarangelo, M. D. Fleming, W. Al-Herz, L. M. Kunkel and R. S. Geha (2016). "A missense mutation in *TFRC*, encoding transferrin receptor 1, causes combined immunodeficiency." Nat Genet **48**(1): 74-78.

Jacobs-Helber, S. M. and S. T. Sawyer (2004). "Jun N-terminal kinase promotes proliferation of immature erythroid cells and erythropoietin-dependent cell lines." Blood **104**(3): 696-703.

Jaeggi, T., G. A. Kortman, D. Moretti, C. Chassard, P. Holding, A. Dostal, J. Boekhorst, H. M. Timmerman, D. W. Swinkels, H. Tjalsma, J. Njenga, A. Mwangi, J. Kvalsvig, C. Lacroix and M. B. Zimmermann (2015). "Iron fortification adversely affects the gut microbiome, increases pathogen abundance and induces intestinal inflammation in Kenyan infants." Gut **64**(5): 731-742.

Jantaratnotai, N., P. Utaisincharoen, P. Piyachaturawat, S. Chongthammakun and Y. Sanvarinda (2006). "Inhibitory effect of *Curcuma comosa* on NO production and cytokine expression in LPS-activated microglia." Life Sci **78**(6): 571-577.

Jariyawat, S., P. Kigpituck, K. Suksen, A. Chuncharunee, A. Chaovanalikit and P. Piyachaturawat (2009). "Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice by *Curcuma comosa* Roxb. ethanol extract." J Nat Med **63**(4): 430-436.

Jariyawat, S., T. Thammapratip, K. Suksen, P. Wanitchakool, J. Nateewattana, A. Chairoungdua, A. Suksamrarn and P. Piyachaturawat (2011). "Induction of apoptosis in murine leukemia by diarylheptanoids from *Curcuma comosa* Roxb." Cell Biol Toxicol **27**(6): 413-423.

Jian, J., Q. Yang and X. Huang (2011). "Src regulates Tyr(20) phosphorylation of transferrin receptor-1 and potentiates breast cancer cell survival." J Biol Chem **286**(41): 35708-35715.

Jitsanong, T., K. Khanobdee, P. Piyachaturawat and K. Wongprasert (2011). "Diarylheptanoid 7-(3,4 dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-1-phenyl-(1E)-1-heptene from *Curcuma comosa* Roxb. protects retinal pigment epithelial cells against oxidative stress-induced cell death." Toxicol In Vitro **25**(1): 167-176.

Johnson, L., D. Greenbaum, K. Cichowski, K. Mercer, E. Murphy, E. Schmitt, R. T. Bronson, H. Umanoff, W. Edelmann, R. Kucherlapati and T. Jacks (1997). "K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras." Genes Dev **11**(19): 2468-2481.

Johnson, M. B., J. Chen, N. Murchison, F. A. Green and C. A. Enns (2007). "Transferrin receptor 2: evidence for ligand-induced stabilization and redirection to a recycling pathway." Mol Biol Cell **18**(3): 743-754.

- Johnson, M. B. and C. A. Enns (2004). "Diferric transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability." Blood **104**(13): 4287-4293.
- Johnstone, R. M. (1992). "The Jeanne Manery-Fisher Memorial Lecture 1991. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins." Biochem Cell Biol **70**(3-4): 179-190.
- Joshi, P. A., H. W. Jackson, A. G. Beristain, M. A. Di Grappa, P. A. Mote, C. L. Clarke, J. Stingl, P. D. Waterhouse and R. Khokha (2010). "Progesterone induces adult mammary stem cell expansion." Nature **465**(7299): 803-807.
- K**
- Kasibhatla, S., K. A. Jessen, S. Maliartchouk, J. Y. Wang, N. M. English, J. Drewe, L. Qiu, S. P. Archer, A. E. Ponce, N. Sirisoma, S. Jiang, H. Z. Zhang, K. R. Gehlsen, S. X. Cai, D. R. Green and B. Tseng (2005). "A role for transferrin receptor in triggering apoptosis when targeted with gambogic acid." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(34): 12095-12100.
- Katayama, N., J. P. Shih, S. Nishikawa, T. Kina, S. C. Clark and M. Ogawa (1993). "Stage-specific expression of c-kit protein by murine hematopoietic progenitors." Blood **82**(8): 2353-2360.
- Kautz, L., G. Jung, X. Du, V. Gabayan, J. Chapman, M. Nasoff, E. Nemeth and T. Ganz (2015). "Erythroferrone contributes to hepcidin suppression and iron overload in a mouse model of beta-thalassemia." Blood **126**(17): 2031-2037.
- Kautz, L., G. Jung, E. V. Valore, S. Rivella, E. Nemeth and T. Ganz (2014). "Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism." Nat Genet **46**(7): 678-684.
- Kawabata, H. (2019). "Transferrin and transferrin receptors update." Free Radic Biol Med **133**: 46-54.
- Kawabata, H., R. E. Fleming, D. Gui, S. Y. Moon, T. Saitoh, J. O'Kelly, Y. Umehara, Y. Wano, J. W. Said and H. P. Koeffler (2005). "Expression of hepcidin is down-regulated in TfR2 mutant mice manifesting a phenotype of hereditary hemochromatosis." Blood **105**(1): 376-381.
- Kawabata, H., R. S. Germain, T. Ikezoe, X. Tong, E. M. Green, A. F. Gombart and H. P. Koeffler (2001). "Regulation of expression of murine transferrin receptor 2." Blood **98**(6): 1949-1954.
- Kawabata, H., R. S. Germain, P. T. Vuong, T. Nakamaki, J. W. Said and H. P. Koeffler (2000). "Transferrin receptor 2-alpha supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo." J Biol Chem **275**(22): 16618-16625.
- Kawabata, H., T. Nakamaki, P. Ikonomi, R. D. Smith, R. S. Germain and H. P. Koeffler (2001). "Expression of transferrin receptor 2 in normal and neoplastic hematopoietic cells." Blood **98**(9): 2714-2719.
- Kawabata, H., R. Yang, T. Hirama, P. T. Vuong, S. Kawano, A. F. Gombart and H. P. Koeffler (1999). "Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family." J Biol Chem **274**(30): 20826-20832.
- Kelley, L. L., M. J. Koury, M. C. Bondurant, S. T. Koury, S. T. Sawyer and A. Wickrema (1993). "Survival or death of individual proerythroblasts results from differing erythropoietin sensitivities: a mechanism for controlled rates of erythrocyte production." Blood **82**(8): 2340-2352.
- Kenneth, N. S., S. Mudie, S. Naron and S. Rocha (2013). "TfR1 interacts with the IKK complex and is involved in IKK-NF-kappaB signalling." Biochem J **449**(1): 275-284.
- Kerenyi, M. A., F. Grebien, H. Gehart, M. Schiffrer, M. Artaker, B. Kovacic, H. Beug, R. Moriggl and E. W. Mullner (2008). "Stat5 regulates cellular iron uptake of erythroid cells via IRP-2 and TfR-1." Blood **112**(9): 3878-3888.
- Khalaf, W. F., H. White, M. J. Wenning, A. Orazi, R. Kapur and D. A. Ingram (2005). "K-Ras is essential for normal fetal liver erythropoiesis." Blood **105**(9): 3538-3541.
- Kim, H. R., J. H. Lee, H. R. Heo, S. R. Yang, K. S. Ha, W. S. Park, E. T. Han, H. Song and S. H. Hong (2016). "Improved hematopoietic differentiation of human pluripotent stem cells via estrogen receptor signaling pathway." Cell Biosci **6**(1): 50.
- Kirito, K., K. Nakajima, T. Watanabe, M. Uchida, M. Tanaka, K. Ozawa and N. Komatsu (2002). "Identification of the human erythropoietin receptor region required for Stat1 and Stat3 activation." Blood **99**(1): 102-110.
- Kocaadam, B. and N. Sanlier (2017). "Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health." Crit Rev Food Sci Nutr **57**(13): 2889-2895.

Koera, K., K. Nakamura, K. Nakao, J. Miyoshi, K. Toyoshima, T. Hatta, H. Otani, A. Aiba and M. Katsuki (1997). "K-ras is essential for the development of the mouse embryo." Oncogene **15**(10): 1151-1159.

Komatsu, N., M. Kunitama, M. Yamada, T. Hagiwara, T. Kato, H. Miyazaki, M. Eguchi, M. Yamamoto and Y. Miura (1996). "Establishment and characterization of the thrombopoietin-dependent megakaryocytic cell line, UT-7/TPO." Blood **87**(11): 4552-4560.

Komatsu, N., H. Nakauchi, A. Miwa, T. Ishihara, M. Eguchi, M. Moroi, M. Okada, Y. Sato, H. Wada, Y. Yawata and et al. (1991). "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**(1): 341-348.

Komatsu, N., M. Yamamoto, H. Fujita, A. Miwa, K. Hatake, T. Endo, H. Okano, T. Katsube, Y. Fukumaki, S. Sassa and et al. (1993). "Establishment and characterization of an erythropoietin-dependent subline, UT-7/Epo, derived from human leukemia cell line, UT-7." Blood **82**(2): 456-464.

Kortman, G. A., M. Raffatellu, D. W. Swinkels and H. Tjalsma (2014). "Nutritional iron turned inside out: intestinal stress from a gut microbial perspective." FEMS Microbiol Rev **38**(6): 1202-1234.

Kosmider, O., D. Buet, I. Gallais, N. Denis and F. Moreau-Gachelin (2009). "Erythropoietin down-regulates stem cell factor receptor (Kit) expression in the leukemic proerythroblast: role of Lyn kinase." PLoS One **4**(5): e5721.

Kostelac, D., G. Rechkemmer and K. Briviba (2003). "Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element." J Agric Food Chem **51**(26): 7632-7635.

Koury, M. J. and M. C. Bondurant (1990). "Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells." Science **248**(4953): 378-381.

Koury, S. T., M. J. Koury, M. C. Bondurant, J. Caro and S. E. Graber (1989). "Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration." Blood **74**(2): 645-651.

Krege, J. H., J. B. Hodgins, J. F. Couse, E. Enmark, M. Warner, J. F. Mahler, M. Sar, K. S. Korach, J. A. Gustafsson and O. Smithies (1998). "Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15677-15682.

Kuiper, G. G., B. Carlsson, K. Grandien, E. Enmark, J. Haggblad, S. Nilsson and J. A. Gustafsson (1997). "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta." Endocrinology **138**(3): 863-870.

Kuiper, G. G., J. G. Lemmen, B. Carlsson, J. C. Corton, S. H. Safe, P. T. van der Saag, B. van der Burg and J. A. Gustafsson (1998). "Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta." Endocrinology **139**(10): 4252-4263.

L

Lamartiniere, C. A. (2000). "Protection against breast cancer with genistein: a component of soy." Am J Clin Nutr **71**(6 Suppl): 1705S-1707S; discussion 1708S-1709S.

Le Romancer, M., C. Poulard, P. Cohen, S. Sentis, J. M. Renoir and L. Corbo (2011). "Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors." Endocr Rev **32**(5): 597-622.

Lebron, J. A., M. J. Bennett, D. E. Vaughn, A. J. Chirino, P. M. Snow, G. A. Mintier, J. N. Feder and P. J. Bjorkman (1998). "Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor." Cell **93**(1): 111-123.

Lee, P., M. H. Hsu, J. Welser-Alves and H. Peng (2012). "Severe microcytic anemia but increased erythropoiesis in mice lacking Hfe or Tfr2 and Tmprss6." Blood Cells Mol Dis **48**(3): 173-178.

Leeman, D. S. and A. Brunet (2014). "Stem cells: Sex specificity in the blood." Nature **505**(7484): 488-490.

Lei, R., K. Zhang, K. Liu, X. Shao, Z. Ding, F. Wang, Y. Hong, M. Zhu, H. Li and H. Li (2016). "Transferrin receptor facilitates TGF-beta and BMP signaling activation to control craniofacial morphogenesis." Cell Death Dis **7**(6): e2282.

Lei, Z., Z. Xiaoying and L. Xingguo (2009). "Ovariectomy-associated changes in bone mineral density and bone marrow haematopoiesis in rats." Int J Exp Pathol **90**(5): 512-519.

Levy, J. E., O. Jin, Y. Fujiwara, F. Kuo and N. C. Andrews (1999). "Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system." Nat Genet **21**(4): 396-399.

- Li, H., A. C. Rybicki, S. M. Suzuka, L. von Bonsdorff, W. Breuer, C. B. Hall, Z. I. Cabantchik, E. E. Bouhassira, M. E. Fabry and Y. Z. Ginzburg (2010). "Transferrin therapy ameliorates disease in beta-thalassemic mice." Nat Med **16**(2): 177-182.
- Li, J., J. Hale, P. Bhagia, F. Xue, L. Chen, J. Jaffray, H. Yan, J. Lane, P. G. Gallagher, N. Mohandas, J. Liu and X. An (2014). "Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors: BFU-E and CFU-E." Blood **124**(24): 3636-3645.
- Li, L., C. J. Fang, J. C. Ryan, E. C. Niemi, J. A. Lebron, P. J. Bjorkman, H. Arase, F. M. Torti, S. V. Torti, M. C. Nakamura and W. E. Seaman (2010). "Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(8): 3505-3510.
- Li, L. and B. Frei (2006). "Iron chelation inhibits NF-kappaB-mediated adhesion molecule expression by inhibiting p22(phox) protein expression and NADPH oxidase activity." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(12): 2638-2643.
- Liang, J. and Y. Shang (2013). "Estrogen and cancer." Annu Rev Physiol **75**: 225-240.
- Liang, R. and S. Ghaffari (2016). "Advances in understanding the mechanisms of erythropoiesis in homeostasis and disease." Br J Haematol **174**(5): 661-673.
- Libani, I. V., E. C. Guy, L. Melchiori, R. Schiro, P. Ramos, L. Breda, T. Scholzen, A. Chadburn, Y. Liu, M. Kernbach, B. Baron-Luhr, M. Porotto, M. de Sousa, E. A. Rachmilewitz, J. D. Hood, M. D. Cappellini, P. J. Giardina, R. W. Grady, J. Gerdes and S. Rivella (2008). "Decreased differentiation of erythroid cells exacerbates ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia." Blood **112**(3): 875-885.
- Lill, R. (2009). "Function and biogenesis of iron-sulphur proteins." Nature **460**(7257): 831-838.
- Lilly, M., T. Le, P. Holland and S. L. Hendrickson (1992). "Sustained expression of the pim-1 kinase is specifically induced in myeloid cells by cytokines whose receptors are structurally related." Oncogene **7**(4): 727-732.
- Liu, A. P., F. Aguet, G. Danuser and S. L. Schmid (2010). "Local clustering of transferrin receptors promotes clathrin-coated pit initiation." J Cell Biol **191**(7): 1381-1393.
- Lo, B. (2016). "The requirement of iron transport for lymphocyte function." Nat Genet **48**(1): 10-11.
- Lodish, H., J. Flygare and S. Chou (2010). "From stem cell to erythroblast: regulation of red cell production at multiple levels by multiple hormones." IUBMB Life **62**(7): 492-496.
- Lok, C. N. and P. Ponka (1999). "Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene." J Biol Chem **274**(34): 24147-24152.
- Lubahn, D. B., J. S. Moyer, T. S. Golding, J. F. Couse, K. S. Korach and O. Smithies (1993). "Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(23): 11162-11166.

M

- Macia, E., M. Ehrlich, R. Massol, E. Boucrot, C. Brunner and T. Kirchhausen (2006). "Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin." Dev Cell **10**(6): 839-850.
- Mafodda, A., D. Giuffrida, A. Prestifilippo, D. Azzarello, R. Giannicola, M. Mare and R. Maisano (2017). "Oral sucrosomial iron versus intravenous iron in anemic cancer patients without iron deficiency receiving darbepoetin alfa: a pilot study." Support Care Cancer **25**(9): 2779-2786.
- Malgor, L. A., M. Valsecia, E. Verges and E. E. De Markowsky (1998). "Blockade of the in vitro effects of testosterone and erythropoietin on CfU-E and Bfu-E proliferation by pretreatment of the donor rats with cyproterone and flutamide." Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam **48**(2): 99-105.
- Maret, A., J. D. Coudert, L. Garidou, G. Foucras, P. Gourdy, A. Krust, S. Dupont, P. Chambon, P. Druet, F. Bayard and J. C. Guery (2003). "Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells." Eur J Immunol **33**(2): 512-521.
- Martin, D. N. and S. L. Uprichard (2013). "Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(26): 10777-10782.
- Maslinski, W., B. Remillard, M. Tsudo and T. B. Strom (1992). "Interleukin-2 (IL-2) induces tyrosine kinase-dependent translocation of active raf-1 from the IL-2 receptor into the cytosol." J Biol Chem **267**(22): 15281-15284.
- Mastroberardino, P. G., E. K. Hoffman, M. P. Horowitz, R. Betarbet, G. Taylor, D. Cheng, H. M. Na, C. A. Gutekunst, M. Gearing, J. Q. Trojanowski, M. Anderson, C. T. Chu, J. Peng and J. T. Greenamyre (2009). "A novel transferrin/TfR2-mediated mitochondrial iron transport system is disrupted in Parkinson's disease." Neurobiol Dis **34**(3): 417-431.

- Matak, P., A. Matak, S. Moustafa, D. K. Aryal, E. J. Benner, W. Wetsel and N. C. Andrews (2016). "Disrupted iron homeostasis causes dopaminergic neurodegeneration in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(13): 3428-3435.
- Mathias, L. A., T. C. Fisher, L. Zeng, H. J. Meiselman, K. I. Weinberg, A. L. Hiti and P. Malik (2000). "Ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia major is due to apoptosis at the polychromatophilic normoblast stage." Exp Hematol **28**(12): 1343-1353.
- Matsuo, S., M. Ogawa, M. U. Muckenthaler, Y. Mizui, S. Sasaki, T. Fujimura, M. Takizawa, N. Ariga, H. Ozaki, M. Sakaguchi, F. J. Gonzalez and Y. Inoue (2015). "Hepatocyte Nuclear Factor 4alpha Controls Iron Metabolism and Regulates Transferrin Receptor 2 in Mouse Liver." J Biol Chem **290**(52): 30855-30865.
- Matysiak-Budnik, T., I. C. Moura, M. Arcos-Fajardo, C. Lebreton, S. Menard, C. Candalh, K. Ben-Khalifa, C. Dugave, H. Tamouza, G. van Niel, Y. Bouhnik, D. Lamarque, S. Chaussade, G. Malamut, C. Cellier, N. Cerf-Bensussan, R. C. Monteiro and M. Heyman (2008). "Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease." J Exp Med **205**(1): 143-154.
- Maxwell, P. H., D. J. Ferguson, M. K. Osmond, C. W. Pugh, A. Heryet, B. G. Doe, M. H. Johnson and P. J. Ratcliffe (1994). "Expression of a homologously recombined erythropoietin-SV40 T antigen fusion gene in mouse liver: evidence for erythropoietin production by Ito cells." Blood **84**(6): 1823-1830.
- Maxwell, P. H., M. K. Osmond, C. W. Pugh, A. Heryet, L. G. Nicholls, C. C. Tan, B. G. Doe, D. J. Ferguson, M. H. Johnson and P. J. Ratcliffe (1993). "Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice." Kidney Int **44**(5): 1149-1162.
- Maymon, R., S. Strauss, Z. Vaknin, Z. Weinraub, A. Herman and G. Gayer (2006). "Normal sonographic values of maternal spleen size throughout pregnancy." Ultrasound Med Biol **32**(12): 1827-1831.
- McDonald, T. P. and P. S. Sullivan (1993). "Megakaryocytic and erythrocytic cell lines share a common precursor cell." Exp Hematol **21**(10): 1316-1320.
- McNiece, I. K. and R. A. Briddell (1995). "Stem cell factor." J Leukoc Biol **58**(1): 14-22.
- Medina, K. L., K. P. Garrett, L. F. Thompson, M. I. Rossi, K. J. Payne and P. W. Kincade (2001). "Identification of very early lymphoid precursors in bone marrow and their regulation by estrogen." Nat Immunol **2**(8): 718-724.
- Medina, K. L. and P. W. Kincade (1994). "Pregnancy-related steroids are potential negative regulators of B lymphopoiesis." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(12): 5382-5386.
- Medina, K. L., A. Strasser and P. W. Kincade (2000). "Estrogen influences the differentiation, proliferation, and survival of early B-lineage precursors." Blood **95**(6): 2059-2067.
- Merz-Demlow, B. E., A. M. Duncan, K. E. Wangen, X. Xu, T. P. Carr, W. R. Phipps and M. S. Kurzer (2000). "Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women." Am J Clin Nutr **71**(6): 1462-1469.
- Messa, E., S. Carturan, C. Maffe, M. Pautasso, E. Bracco, A. Roetto, F. Messa, F. Arruga, I. Defilippi, V. Rosso, C. Zanone, A. Rotolo, E. Greco, R. M. Pellegrino, D. Alberti, G. Saglio and D. Cilloni (2010). "Deferasirox is a powerful NF-kappaB inhibitor in myelodysplastic cells and in leukemia cell lines acting independently from cell iron deprivation by chelation and reactive oxygen species scavenging." Haematologica **95**(8): 1308-1316.
- Messori, L. and F. Kratz (1994). "Transferrin: from inorganic biochemistry to medicine." Met Based Drugs **1**(2-3): 161-167.
- Mirand, E. A. and A. S. Gordon (1966). "Mechanism of estrogen action in erythropoiesis." Endocrinology **78**(2): 325-332.
- Miura, O., Y. Miura, N. Nakamura, F. W. Quelle, B. A. Witthuhn, J. N. Ihle and N. Aoki (1994). "Induction of tyrosine phosphorylation of Vav and expression of Pim-1 correlates with Jak2-mediated growth signaling from the erythropoietin receptor." Blood **84**(12): 4135-4141.
- Miyake, T., C. K. Kung and E. Goldwasser (1977). "Purification of human erythropoietin." J Biol Chem **252**(15): 5558-5564.
- Miyazawa, K., D. A. Williams, A. Gotoh, J. Nishimaki, H. E. Broxmeyer and K. Toyama (1995). "Membrane-bound Steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encoded protein than its soluble form." Blood **85**(3): 641-649.
- Moura, I. C., M. Arcos-Fajardo, A. Gdoura, V. Leroy, C. Sadaka, N. Mahlaoui, Y. Lepelletier, F. Vrtovsniak, E. Haddad, M. Benhamou and R. C. Monteiro (2005). "Engagement of transferrin

receptor by polymeric IgA1: evidence for a positive feedback loop involving increased receptor expression and mesangial cell proliferation in IgA nephropathy." J Am Soc Nephrol **16**(9): 2667-2676.

Moura, I. C., M. Arcos-Fajardo, C. Sadaka, V. Leroy, M. Benhamou, J. Novak, F. Vrtovsniak, E. Haddad, K. R. Chintalacharuvu and R. C. Monteiro (2004). "Glycosylation and size of IgA1 are essential for interaction with mesangial transferrin receptor in IgA nephropathy." J Am Soc Nephrol **15**(3): 622-634.

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**(4): 417-425.

Moura, I. C., O. Hermine, C. Lacombe and P. Mayeux (2015). "Erythropoiesis and transferrin receptors." Curr Opin Hematol **22**(3): 193-198.

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**(5): 1838-1845.

Muta, K., S. B. Krantz, M. C. Bondurant and C. H. Dai (1995). "Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation." Blood **86**(2): 572-580.

N

Nai, A., M. R. Lidonnici, M. Rausa, G. Mandelli, A. Pagani, L. Silvestri, G. Ferrari and C. Camaschella (2015). "The second transferrin receptor regulates red blood cell production in mice." Blood **125**(7): 1170-1179.

Nai, A., R. M. Pellegrino, M. Rausa, A. Pagani, M. Boero, L. Silvestri, G. Saglio, A. Roetto and C. Camaschella (2014). "The erythroid function of transferrin receptor 2 revealed by Tmprss6 inactivation in different models of transferrin receptor 2 knockout mice." Haematologica **99**(6): 1016-1021.

Nakada, D., H. Oguro, B. P. Levi, N. Ryan, A. Kitano, Y. Saitoh, M. Takeichi, G. R. Wendt and S. J. Morrison (2014). "Oestrogen increases haematopoietic stem-cell self-renewal in females and during pregnancy." Nature **505**(7484): 555-558.

Nakamura, T., Y. Imai, T. Matsumoto, S. Sato, K. Takeuchi, K. Igarashi, Y. Harada, Y. Azuma, A. Krust, Y. Yamamoto, H. Nishina, S. Takeda, H. Takayanagi, D. Metzger, J. Kanno, K. Takaoka, T. J. Martin, P. Chambon and S. Kato (2007). "Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts." Cell **130**(5): 811-823.

Nelles, J. L., W. Y. Hu and G. S. Prins (2011). "Estrogen action and prostate cancer." Expert Rev Endocrinol Metab **6**(3): 437-451.

Nemeth, E. and T. Ganz (2006). "Regulation of iron metabolism by hepcidin." Annu Rev Nutr **26**: 323-342.

Nemeth, E., A. Roetto, G. Garozzo, T. Ganz and C. Camaschella (2005). "Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis." Blood **105**(4): 1803-1806.

Nemeth, E., M. S. Tuttle, J. Powelson, M. B. Vaughn, A. Donovan, D. M. Ward, T. Ganz and J. Kaplan (2004). "Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization." Science **306**(5704): 2090-2093.

Nicolas, G., M. Bennoun, I. Devaux, C. Beaumont, B. Grandchamp, A. Kahn and S. Vaulont (2001). "Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8780-8785.

Nicolas, G., M. Bennoun, A. Porteu, S. Mativet, C. Beaumont, B. Grandchamp, M. Sirtito, M. Sawadogo, A. Kahn and S. Vaulont (2002). "Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4596-4601.

Nilsson, S., S. Makela, E. Treuter, M. Tujague, J. Thomsen, G. Andersson, E. Enmark, K. Pettersson, M. Warner and J. A. Gustafsson (2001). "Mechanisms of estrogen action." Physiol Rev **81**(4): 1535-1565.

Nyga, R., C. Pecquet, N. Harir, H. Gu, I. Dhennin-Duthille, A. Regnier, V. Gouilleux-Gruart, K. Lassoued and F. Gouilleux (2005). "Activated STAT5 proteins induce activation of the PI 3-kinase/Akt and Ras/MAPK pathways via the Gab2 scaffolding adapter." Biochem J **390**(Pt 1): 359-366.

O

Okada, M. (2012). "Regulation of the SRC family kinases by Csk." Int J Biol Sci **8**(10): 1385-1397.

Okasha, S. A., S. Ryu, Y. Do, R. J. McKallip, M. Nagarkatti and P. S. Nagarkatti (2001). "Evidence for estradiol-induced apoptosis and dysregulated T cell maturation in the thymus." Toxicology **163**(1): 49-62.

Okutani, Y., A. Kitanaka, T. Tanaka, H. Kamano, H. Ohnishi, Y. Kubota, T. Ishida and J. Takahara (2001). "Src directly tyrosine-phosphorylates STAT5 on its activation site and is involved in erythropoietin-induced signaling pathway." Oncogene **20**(45): 6643-6650.

Ornstein, D. L. and L. R. Zacharski (2007). "Iron stimulates urokinase plasminogen activator expression and activates NF-kappa B in human prostate cancer cells." Nutr Cancer **58**(1): 115-126.

Ostrowski, D. and R. Heinrich (2018). "Alternative Erythropoietin Receptors in the Nervous System." J Clin Med **7**(2).

P

Pagani, A., M. Vieillevoys, A. Nai, M. Rausa, M. Ladli, C. Lacombe, P. Mayeux, F. Verdier, C. Camaschella and L. Silvestri (2015). "Regulation of cell surface transferrin receptor-2 by iron-dependent cleavage and release of a soluble form." Haematologica **100**(4): 458-465.

Paganini, D. and M. B. Zimmermann (2017). "The effects of iron fortification and supplementation on the gut microbiome and diarrhea in infants and children: a review." Am J Clin Nutr **106**(Suppl 6): 1688s-1693s.

Paharkova-Vatchkova, V., R. Maldonado and S. Kovats (2004). "Estrogen preferentially promotes the differentiation of CD11c+ CD11b(intermediate) dendritic cells from bone marrow precursors." J Immunol **172**(3): 1426-1436.

Pantopoulos, K. (2015). "TfR2 links iron metabolism and erythropoiesis." Blood **125**(7): 1055-1056.

Papanikolaou, G., M. E. Samuels, E. H. Ludwig, M. L. MacDonald, P. L. Franchini, M. P. Dube, L. Andres, J. MacFarlane, N. Sakellaropoulos, M. Politou, E. Nemeth, J. Thompson, J. K. Risler, C. Zaborowska, R. Babakiaff, C. C. Radomski, T. D. Pape, O. Davidas, J. Christakis, P. Brissot, G. Lockitch, T. Ganz, M. R. Hayden and Y. P. Goldberg (2004). "Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis." Nat Genet **36**(1): 77-82.

Parkkinen, J., L. Sahlstedt, L. von Bonsdorff, H. Salo, F. Ebeling and T. Ruutu (2006). "Effect of repeated apotransferrin administrations on serum iron parameters in patients undergoing myeloablative conditioning and allogeneic stem cell transplantation." Br J Haematol **135**(2): 228-234.

Parsons, S. J. and J. T. Parsons (2004). "Src family kinases, key regulators of signal transduction." Oncogene **23**(48): 7906-7909.

Pearce, S. T. and V. C. Jordan (2004). "The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer." Crit Rev Oncol Hematol **50**(1): 3-22.

Pellegrino, R. M., F. Riondato, L. Ferbo, M. Boero, A. Palmieri, L. Osella, P. Pollicino, B. Miniscalco, G. Saglio and A. Roetto (2017). "Altered Erythropoiesis in Mouse Models of Type 3 Hemochromatosis." Biomed Res Int **2017**: 2408941.

Peyssonnaud, C., V. Nizet and R. S. Johnson (2008). "Role of the hypoxia inducible factors HIF in iron metabolism." Cell Cycle **7**(1): 28-32.

Phuc, L. H., M. Papiernik, S. Berrih and D. Duval (1981). "Thymic involution in pregnant mice. I. Characterization of the remaining thymocyte subpopulations." Clin Exp Immunol **44**(2): 247-252.

Pigeon, C., G. Ilyin, B. Coursaud, P. Leroyer, B. Turlin, P. Brissot and O. Loreal (2001). "A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload." J Biol Chem **276**(11): 7811-7819.

Piyachaturawat, P., J. Charoenpiboonsin, C. Toskulkao and A. Suksamrarn (1999). "Reduction of plasma cholesterol by Curcuma comosa extract in hypercholesterolaemic hamsters." J Ethnopharmacol **66**(2): 199-204.

Piyachaturawat, P., S. Ercharuporn and A. Suksamrarn (1995). "Estrogenic activity of Curcuma comosa extract in rats." Asia Pacific Journal of Pharmacology **10**: 121-126.

Piyachaturawat, P., S. Ercharuporn and A. Suksamrarn (1995). "Uterotrophic Effect of Curcuma comosa in Rats." International Journal of Pharmacognosy **33**(4): 334-338.

- Piyachaturawat, P., N. Teeratagolpibal, C. Toskulkao and A. Suksamrarn (1997). "Hypolipidemic effect of Curcuma comosa in mice." Artery **22**(5): 233-241.
- Poli, M., S. Lusciati, V. Gandini, F. Maccarinelli, D. Finazzi, L. Silvestri, A. Roetto and P. Arosio (2010). "Transferrin receptor 2 and HFE regulate furin expression via mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) signaling. Implications for transferrin-dependent hepcidin regulation." Haematologica **95**(11): 1832-1840.
- Ponka, P. and C. N. Lok (1999). "The transferrin receptor: role in health and disease." Int J Biochem Cell Biol **31**(10): 1111-1137.
- Prasannarong, M., V. Saengsirisuwan, P. Piyachaturawat and A. Suksamrarn (2012). "Improvements of insulin resistance in ovariectomized rats by a novel phytoestrogen from Curcuma comosa Roxb." BMC Complement Altern Med **12**: 28.
- Prentice, R. L. and G. L. Anderson (2008). "The women's health initiative: lessons learned." Annu Rev Public Health **29**: 131-150.
- Princiotto, J. V. and E. J. Zapolski (1976). "Functional heterogeneity and pH-dependent dissociation properties of human transferrin." Biochim Biophys Acta **428**(3): 766-771.

Q

- Qiu, X., X. G. Yuan, X. L. Jin, X. He, L. Zhu and X. Y. Zhao (2012). "Oestrogen-deficiency inducing haematopoiesis dysfunction via reduction in haematopoietic stem cells and haematopoietic growth factors in rats." Int J Exp Pathol **93**(3): 179-187.

R

- R'Zik, S., M. Loo and Y. Beguin (2001). "Reticulocyte transferrin receptor (TfR) expression and contribution to soluble TfR levels." Haematologica **86**(3): 244-251.
- Radoshitzky, S. R., J. Abraham, C. F. Spiropoulou, J. H. Kuhn, D. Nguyen, W. Li, J. Nagel, P. J. Schmidt, J. H. Nunberg, N. C. Andrews, M. Farzan and H. Choe (2007). "Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses." Nature **446**(7131): 92-96.
- Ramey, G., J. C. Deschemin and S. Vaulont (2009). "Cross-talk between the mitogen activated protein kinase and bone morphogenetic protein/hemojuvelin pathways is required for the induction of hepcidin by holotransferrin in primary mouse hepatocytes." Haematologica **94**(6): 765-772.
- Rauner, M., U. Baschant, A. Roetto, R. M. Pellegrino, S. Rother, J. Salbach-Hirsch, H. Weidner, V. Hintze, G. Campbell, A. Petzold, R. Lemaitre, I. Henry, T. Bellido, I. Theurl, S. Altamura, S. Colucci, M. U. Muckenthaler, G. Schett, D. Komla Ebri, J. H. D. Bassett, G. R. Williams, U. Platzbecker and L. C. Hofbauer (2019). "Transferrin receptor 2 controls bone mass and pathological bone formation via BMP and Wnt signaling." Nat Metab **1**(1): 111-124.
- Reisner, E. H., Jr. (1966). "Tissue culture of bone marrow. II. Effect of steroid hormones on hematopoiesis in vitro." Blood **27**(4): 460-469.
- Ribeil, J. A., Y. Zermati, J. Vandekerckhove, S. Cathelin, J. Kersual, M. Dussiot, S. Coulon, I. C. Moura, A. Zeuner, T. Kirkegaard-Sorensen, B. Varet, E. Solary, C. Garrido and O. Hermine (2007). "Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1." Nature **445**(7123): 102-105.
- Richardson, D. R. and P. Ponka (1997). "The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells." Biochim Biophys Acta **1331**(1): 1-40.
- Richmond, T. D., M. Chohan and D. L. Barber (2005). "Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin." Trends Cell Biol **15**(3): 146-155.
- Ricketts, M. L., D. D. Moore, W. J. Banz, O. Mezei and N. F. Shay (2005). "Molecular mechanisms of action of the soy isoflavones includes activation of promiscuous nuclear receptors. A review." J Nutr Biochem **16**(6): 321-330.
- Rishi, G., E. M. Crampton, D. F. Wallace and V. N. Subramaniam (2013). "In situ proximity ligation assays indicate that hemochromatosis proteins Hfe and transferrin receptor 2 (Tfr2) do not interact." PLoS One **8**(10): e72767.
- Rishi, G., E. S. Secondes, D. F. Wallace and V. N. Subramaniam (2016). "Hematopoietic deletion of transferrin receptor 2 in mice leads to a block in erythroid differentiation during iron-deficient anemia." Am J Hematol **91**(8): 812-818.
- Rishi, G., E. S. Secondes, D. F. Wallace and V. N. Subramaniam (2016). "Normal systemic iron homeostasis in mice with macrophage-specific deletion of transferrin receptor 2." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **310**(3): G171-180.

Robb, A. and M. Wessling-Resnick (2004). "Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin." Blood **104**(13): 4294-4299.

Roetto, A., F. Di Cunto, R. M. Pellegrino, E. Hirsch, O. Azzolino, A. Bondi, I. Defilippi, S. Carturan, B. Miniscalco, F. Riondato, D. Cilloni, L. Silengo, F. Altruda, C. Camaschella and G. Saglio (2010). "Comparison of 3 Tfr2-deficient murine models suggests distinct functions for Tfr2-alpha and Tfr2-beta isoforms in different tissues." Blood **115**(16): 3382-3389.

Rolfs, A., I. Kvietikova, M. Gassmann and R. H. Wenger (1997). "Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1." J Biol Chem **272**(32): 20055-20062.

Roodman, G. D. (2009). "Osteoclasts pump iron." Cell Metab **9**(5): 405-406.

Roxburgh, W. (1810). "Description of several of the Monandrous plants of India, belonging to the natural order called Scitamineae by Linnaeus, Cannae by Jussieu, and Drimyrhizae by Ventenat in Asiatick Researches " Hindoostanes Press Volume 11: pg. 336 – 337.

S

Sakamoto, S., H. Kawabata, T. Masuda, T. Uchiyama, C. Mizumoto, K. Ohmori, H. P. Koeffler, N. Kadowaki and A. Takaori-Kondo (2015). "H-Ferritin Is Preferentially Incorporated by Human Erythroid Cells through Transferrin Receptor 1 in a Threshold-Dependent Manner." PLoS One **10**(10): e0139915.

Salmeron, A., A. Borroto, M. Fresno, M. J. Crumpton, S. C. Ley and B. Alarcon (1995). "Transferrin receptor induces tyrosine phosphorylation in T cells and is physically associated with the TCR zeta-chain." J Immunol **154**(4): 1675-1683.

Sanchez-Aguilera, A., L. Arranz, D. Martin-Perez, A. Garcia-Garcia, V. Stavropoulou, L. Kubovcakova, J. Isern, S. Martin-Salamanca, X. Langa, R. C. Skoda, J. Schwaller and S. Mendez-Ferrer (2014). "Estrogen signaling selectively induces apoptosis of hematopoietic progenitors and myeloid neoplasms without harming steady-state hematopoiesis." Cell Stem Cell **15**(6): 791-804.

Sawasdiapanich, A. (1994). "Effects of ethanol extract from Curcuma comosa Roxb. on the contraction of intact and isolated rat uterus." Chulalongkorn University. MSc Thesis Abstract.

Schade, A. L. and L. Caroline (1946). "An Iron-binding Component in Human Blood Plasma." Science **104**(2702): 340-341.

Schmidt, P. J., P. T. Toran, A. M. Giannetti, P. J. Bjorkman and N. C. Andrews (2008). "The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression." Cell Metab **7**(3): 205-214.

Schneider, C., M. J. Owen, D. Banville and J. G. Williams (1984). "Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence." Nature **311**(5987): 675-678.

Schneider, C. and J. G. Williams (1985). "Molecular dissection of the human transferrin receptor." J Cell Sci Suppl **3**: 139-149.

Schofield, C. J. and P. J. Ratcliffe (2004). "Oxygen sensing by HIF hydroxylases." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(5): 343-354.

Schranzhofer, M., M. Schifrer, J. A. Cabrera, S. Kopp, P. Chiba, H. Beug and E. W. Mullner (2006). "Remodeling the regulation of iron metabolism during erythroid differentiation to ensure efficient heme biosynthesis." Blood **107**(10): 4159-4167.

Schroeder, C., L. Gibson, C. Nordstrom and H. Beug (1993). "The estrogen receptor cooperates with the TGF alpha receptor (c-erbB) in regulation of chicken erythroid progenitor self-renewal." Embo j **12**(3): 951-960.

Seligman, P. A., J. Kovar, R. B. Schleicher and E. W. Gelfand (1991). "Transferrin-independent iron uptake supports B lymphocyte growth." Blood **78**(6): 1526-1531.

Senyilmaz, D., S. Virtue, X. Xu, C. Y. Tan, J. L. Griffin, A. K. Miller, A. Vidal-Puig and A. A. Teleanu (2015). "Regulation of mitochondrial morphology and function by stearylolation of TFR1." Nature **525**(7567): 124-128.

Sheftel, A. D., A. S. Zhang, C. Brown, O. S. Shirihai and P. Ponka (2007). "Direct interorganellar transfer of iron from endosome to mitochondrion." Blood **110**(1): 125-132.

Shih, Y. J., R. D. Baynes, B. G. Hudson, C. H. Flowers, B. S. Skikne and J. D. Cook (1990). "Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue receptor." J Biol Chem **265**(31): 19077-19081.

Shimon, I. and O. Shpilberg (1995). "The insulin-like growth factor system in regulation of normal and malignant hematopoiesis." Leuk Res **19**(4): 233-240.

Shintani, N., Y. Kohgo, J. Kato, H. Kondo, K. Fujikawa, E. Miyazaki and Y. Niitsu (1994). "Expression and extracellular release of transferrin receptors during peripheral erythroid progenitor cell differentiation in liquid culture." Blood **83**(5): 1209-1215.

Silvestri, L., A. Nai, A. Paganì and C. Camaschella (2014). "The extrahepatic role of TFR2 in iron homeostasis." Front Pharmacol **5**: 93.

Skikne, B. S. and J. D. Cook (1992). "Effect of enhanced erythropoiesis on iron absorption." J Lab Clin Med **120**(5): 746-751.

Socolovsky, M., A. E. Fallon, S. Wang, C. Brugnara and H. F. Lodish (1999). "Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a-/-5b-/- mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction." Cell **98**(2): 181-191.

Sodsai, A., P. Piyachaturawat, S. Sophasan, A. Suksamrarn and M. Vongsakul (2007). "Suppression by Curcuma comosa Roxb. of pro-inflammatory cytokine secretion in phorbol-12-myristate-13-acetate stimulated human mononuclear cells." Int Immunopharmacol **7**(4): 524-531.

Soranzo, N., T. D. Spector, M. Mangino, B. Kuhnel, A. Rendon, A. Teumer, C. Willenborg, B. Wright, L. Chen, M. Li, P. Salo, B. F. Voight, P. Burns, R. A. Laskowski, Y. Xue, S. Menzel, D. Altshuler, J. R. Bradley, S. Bumpstead, M. S. Burnett, J. Devaney, A. Doring, R. Elosua, S. E. Epstein, W. Erber, M. Falchi, S. F. Garner, M. J. Ghorì, A. H. Goodall, R. Gwilliam, H. H. Hakonarson, A. S. Hall, N. Hammond, C. Hengstenberg, T. Illig, I. R. König, C. W. Knouff, R. McPherson, O. Melander, V. Mooser, M. Nauck, M. S. Nieminen, C. J. O'Donnell, L. Peltonen, S. C. Potter, H. Prokisch, D. J. Rader, C. M. Rice, R. Roberts, V. Salomaa, J. Sambrook, S. Schreiber, H. Schunkert, S. M. Schwartz, J. Serbanovic-Canic, J. Sinisalo, D. S. Siscovick, K. Stark, I. Surakka, J. Stephens, J. R. Thompson, U. Volker, H. Volzke, N. A. Watkins, G. A. Wells, H. E. Wichmann, D. A. Van Heel, C. Tyler-Smith, S. L. Thein, S. Kathiresan, M. Perola, M. P. Reilly, A. F. Stewart, J. Erdmann, N. J. Samani, C. Meisinger, A. Greinacher, P. Deloukas, W. H. Ouwehand and C. Gieger (2009). "A genome-wide meta-analysis identifies 22 loci associated with eight hematological parameters in the HaemGen consortium." Nat Genet **41**(11): 1182-1190.

Su, J., B. Sripanidkulchai, K. Sripanidkulchai, P. Piyachaturawat and N. Wara-Aswapati (2011). "Effect of Curcuma comosa and estradiol on the spatial memory and hippocampal estrogen receptor in the post-training ovariectomized rats." J Nat Med **65**(1): 57-62.

Su, J., K. Sripanidkulchai, J. M. Wyss and B. Sripanidkulchai (2010). "Curcuma comosa improves learning and memory function on ovariectomized rats in a long-term Morris water maze test." J Ethnopharmacol **130**(1): 70-75.

Sui, X., S. B. Krantz, M. You and Z. Zhao (1998). "Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis." Blood **92**(4): 1142-1149.

Suksamrarn, A., M. Ponglikitmongkol, K. Wongkrajang, A. Chindaduang, S. Kittidanairak, A. Jankam, B. E. Yingyongnarongkul, N. Kittipanumat, R. Chokchaisiri, P. Khetkam and P. Piyachaturawat (2008). "Diarylheptanoids, new phytoestrogens from the rhizomes of Curcuma comosa: Isolation, chemical modification and estrogenic activity evaluation." Bioorg Med Chem **16**(14): 6891-6902.

Suzuki, N., O. Ohneda, S. Takahashi, M. Higuchi, H. Y. Mukai, T. Nakahata, S. Imagawa and M. Yamamoto (2002). "Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality." Blood **100**(7): 2279-2288.

T

Tacchini, L., L. Bianchi, A. Bernelli-Zazzera and G. Cairo (1999). "Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation." J Biol Chem **274**(34): 24142-24146.

Taher, A. T., D. J. Weatherall and M. D. Cappellini (2018). "Thalassaemia." Lancet **391**(10116): 155-167.

Tan, C. C., K. U. Eckardt, J. D. Firth and P. J. Ratcliffe (1992). "Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia." Am J Physiol **263**(3 Pt 2): F474-481.

Tarng, D. C., T. P. Huang, T. W. Chen and W. C. Yang (1999). "Erythropoietin hyporesponsiveness: from iron deficiency to iron overload." Kidney Int Suppl **69**: S107-118.

Thampithak, A., Y. Jaisin, B. Meesarapee, S. Chongthammakun, P. Piyachaturawat, P. Govitrapong, P. Supavilai and Y. Sanvarinda (2009). "Transcriptional regulation of iNOS and COX-

2 by a novel compound from *Curcuma comosa* in lipopolysaccharide-induced microglial activation." *Neurosci Lett* **462**(2): 171-175.

Thurmond, T. S., F. G. Murante, J. E. Staples, A. E. Silverstone, K. S. Korach and T. A. Gasiewicz (2000). "Role of estrogen receptor alpha in hematopoietic stem cell development and B lymphocyte maturation in the male mouse." *Endocrinology* **141**(7): 2309-2318.

Tolkien, Z., L. Stecher, A. P. Mander, D. I. Pereira and J. J. Powell (2015). "Ferrous sulfate supplementation causes significant gastrointestinal side-effects in adults: a systematic review and meta-analysis." *PLoS One* **10**(2): e0117383.

Torti, M., K. B. Marti, D. Altschuler, K. Yamamoto and E. G. Lapetina (1992). "Erythropoietin induces p21ras activation and p120GAP tyrosine phosphorylation in human erythroleukemia cells." *J Biol Chem* **267**(12): 8293-8298.

Toth, I., L. Yuan, J. T. Rogers, H. Boyce and K. R. Bridges (1999). "Hypoxia alters iron-regulatory protein-1 binding capacity and modulates cellular iron homeostasis in human hepatoma and erythroleukemia cells." *J Biol Chem* **274**(7): 4467-4473.

Touati, D. (2000). "Iron and oxidative stress in bacteria." *Arch Biochem Biophys* **373**(1): 1-6.

Trenor, C. C., 3rd, D. R. Campagna, V. M. Sellers, N. C. Andrews and M. D. Fleming (2000). "The molecular defect in hypotransferrinemic mice." *Blood* **96**(3): 1113-1118.

Trowbridge, I. S. and D. A. Shackelford (1986). "Structure and function of transferrin receptors and their relationship to cell growth." *Biochem Soc Symp* **51**: 117-129.

Turjanski, A. G., J. P. Vaque and J. S. Gutkind (2007). "MAP kinases and the control of nuclear events." *Oncogene* **26**(22): 3240-3253.

U

Uddin, S., J. Ah-Kang, J. Ulaszek, D. Mahmud and A. Wickrema (2004). "Differentiation stage-specific activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(1): 147-152.

Uoshima, N., M. Ozawa, S. Kimura, K. Tanaka, K. Wada, Y. Kobayashi and M. Kondo (1995). "Changes in c-Kit expression and effects of SCF during differentiation of human erythroid progenitor cells." *Br J Haematol* **91**(1): 30-36.

V

Vainchenker, W. and S. N. Constantinescu (2013). "JAK/STAT signaling in hematological malignancies." *Oncogene* **32**(21): 2601-2613.

Verdier, F., P. Walrafen, N. Hubert, S. Chretien, S. Gisselbrecht, C. Lacombe and P. Mayeux (2000). "Proteasomes regulate the duration of erythropoietin receptor activation by controlling down-regulation of cell surface receptors." *J Biol Chem* **275**(24): 18375-18381.

Vogt, T. M., A. D. Blackwell, A. M. Giannetti, P. J. Bjorkman and C. A. Enns (2003). "Heterotypic interactions between transferrin receptor and transferrin receptor 2." *Blood* **101**(5): 2008-2014.

von Bonsdorff, L., L. Sahlstedt, F. Ebeling, T. Ruutu and J. Parkkinen (2004). "Erratum to "Apotransferrin administration prevents growth of *Staphylococcus epidermidis* in serum of stem cell transplant patients by binding of free iron". [FEMS Immunol. Med Microbiol. 37 (2003) 45-51]." *FEMS Immunol Med Microbiol* **40**(2): 173-180.

von Lindern, M., U. Schmidt and H. Beug (2004). "Control of erythropoiesis by erythropoietin and stem cell factor: a novel role for Bruton's tyrosine kinase." *Cell Cycle* **3**(7): 876-879.

Vujic Spasic, M., R. Sparla, K. Mleczko-Sanecka, M. C. Migas, K. Breitkopf-Heinlein, S. Dooley, S. Vaulont, R. E. Fleming and M. U. Muckenthaler (2013). "Smad6 and Smad7 are co-regulated with hepcidin in mouse models of iron overload." *Biochim Biophys Acta* **1832**(1): 76-84

W

Wakao, H., N. Harada, T. Kitamura, A. L. Mui and A. Miyajima (1995). "Interleukin 2 and erythropoietin activate STAT5/MGF via distinct pathways." *EMBO J* **14**(11): 2527-2535.

Wallace, D. F., E. S. Secondes, G. Rishi, L. Ostini, C. J. McDonald, S. W. Lane, T. Vu, J. D. Hooper, G. Velasco, A. J. Ramsay, C. Lopez-Otin and V. N. Subramaniam (2015). "A critical role for murine transferrin receptor 2 in erythropoiesis during iron restriction." *Br J Haematol* **168**(6): 891-901.

- Wallace, D. F., L. Summerville, P. E. Lusby and V. N. Subramaniam (2005). "First phenotypic description of transferrin receptor 2 knockout mouse, and the role of hepcidin." Gut **54**(7): 980-986.
- Wallace, D. F., L. Summerville and V. N. Subramaniam (2007). "Targeted disruption of the hepatic transferrin receptor 2 gene in mice leads to iron overload." Gastroenterology **132**(1): 301-310.
- Wally, J., P. J. Halbrooks, C. Vonrhein, M. A. Rould, S. J. Everse, A. B. Mason and S. K. Buchanan (2006). "The crystal structure of iron-free human serum transferrin provides insight into inter-lobe communication and receptor binding." J Biol Chem **281**(34): 24934-24944.
- Walrafen, P., F. Verdier, Z. Kadri, S. Chretien, C. Lacombe and P. Mayeux (2005). "Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor." Blood **105**(2): 600-608.
- Weerachayaphorn, J., A. Chuncharunee, S. Jariyawat, B. Lewchalermwong, S. Amonpatumrat, A. Suksamrarn and P. Piyachaturawat (2010). "Protection of centrilobular necrosis by Curcuma comosa Roxb. in carbon tetrachloride-induced mice liver injury." J Ethnopharmacol **129**(2): 254-260.
- Weerachayaphorn, J., A. Chuncharunee, C. Mahagita, B. Lewchalermwongse, A. Suksamrarn and P. Piyachaturawat (2011). "A protective effect of Curcuma comosa Roxb. on bone loss in estrogen deficient mice." J Ethnopharmacol **137**(2): 956-962.
- Wessely, O., E. M. Deiner, H. Beug and M. von Lindern (1997). "The glucocorticoid receptor is a key regulator of the decision between self-renewal and differentiation in erythroid progenitors." Embo j **16**(2): 267-280.
- West, A. P., Jr., M. J. Bennett, V. M. Sellers, N. C. Andrews, C. A. Enns and P. J. Bjorkman (2000). "Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE." J Biol Chem **275**(49): 38135-38138.
- Wieland, E. and M. Shipkova (2016). "Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers." Clin Biochem **49**(4-5): 347-354.
- Wilkinson, N. and K. Pantopoulos (2014). "The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models." Front Pharmacol **5**: 176.
- Winuthayanon, W., P. Piyachaturawat, A. Suksamrarn, M. Ponglikitmongkol, Y. Arao, S. C. Hewitt and K. S. Korach (2009). "Diarylheptanoid phytoestrogens isolated from the medicinal plant Curcuma comosa: biologic actions in vitro and in vivo indicate estrogen receptor-dependent mechanisms." Environ Health Perspect **117**(7): 1155-1161.
- Winuthayanon, W., K. Suksen, C. Boonchird, A. Chuncharunee, M. Ponglikitmongkol, A. Suksamrarn and P. Piyachaturawat (2009). "Estrogenic activity of diarylheptanoids from Curcuma comosa Roxb. Requires metabolic activation." J Agric Food Chem **57**(3): 840-845.
- Wognum, A. W., P. M. Lansdorp, R. K. Humphries and G. Krystal (1990). "Detection and isolation of the erythropoietin receptor using biotinylated erythropoietin." Blood **76**(4): 697-705.
- Worthen, C. A. and C. A. Enns (2014). "The role of hepatic transferrin receptor 2 in the regulation of iron homeostasis in the body." Front Pharmacol **5**: 34.
- Wu, H., X. Liu, R. Jaenisch and H. F. Lodish (1995). "Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor." Cell **83**(1): 59-67.

X

- Xia, Y., J. L. Babitt, Y. Sidis, R. T. Chung and H. Y. Lin (2008). "Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin." Blood **111**(10): 5195-5204.
- Xu, M. M., J. Wang and J. X. Xie (2017). "Regulation of iron metabolism by hypoxia-inducible factors." Sheng Li Xue Bao **69**(5): 598-610.
- Xu, W., T. Barrientos, L. Mao, H. A. Rockman, A. A. Sauve and N. C. Andrews (2015). "Lethal Cardiomyopathy in Mice Lacking Transferrin Receptor in the Heart." Cell Rep **13**(3): 533-545.

Y

- Yamada, K., S. Furusawa, K. Saito, K. Waga, T. Koike, H. Arimura, A. Aoyagi, H. Yamato, H. Sakuma, S. Tsunogake and et al. (1995). "Concurrent use of granulocyte colony-stimulating factor with low-dose cytosine arabinoside and aclarubicin for previously treated acute myelogenous leukemia: a pilot study." Leukemia **9**(1): 10-14.
- Yamaoka, K., P. Saharinen, M. Pesu, V. E. Holt, 3rd, O. Silvennoinen and J. J. O'Shea (2004). "The Janus kinases (Jaks)." Genome Biol **5**(12): 253.

Young, S. P., A. Bomford and R. Williams (1984). "The effect of the iron saturation of transferrin on its binding and uptake by rabbit reticulocytes." Biochem J **219**(2): 505-510.

Z

Zermati, Y., C. Garrido, S. Amsellem, S. Fishelson, D. Bouscary, F. Valensi, B. Varet, E. Solary and O. Hermine (2001). "Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation." J Exp Med **193**(2): 247-254.

Zhang, D. L., J. Wu, B. N. Shah, K. C. Greutelaers, M. C. Ghosh, H. Ollivierre, X. Z. Su, P. E. Thuma, G. Bedu-Addo, F. P. Mockenhaupt, V. R. Gordeuk and T. A. Rouault (2018). "Erythrocytic ferroportin reduces intracellular iron accumulation, hemolysis, and malaria risk." Science **359**(6383): 1520-1523.

Zhu, B. M., S. K. McLaughlin, R. Na, J. Liu, Y. Cui, C. Martin, A. Kimura, G. W. Robinson, N. C. Andrews and L. Hennighausen (2008). "Hematopoietic-specific Stat5-null mice display microcytic hypochromic anemia associated with reduced transferrin receptor gene expression." Blood **112**(5): 2071-2080.

Zoller, A. L. and G. J. Kersh (2006). "Estrogen induces thymic atrophy by eliminating early thymic progenitors and inhibiting proliferation of beta-selected thymocytes." J Immunol **176**(12): 7371-7378.

Zumerle, S., J. R. Mathieu, S. Delga, M. Heinis, L. Viatte, S. Vaulont and C. Peyssonnaud (2014). "Targeted disruption of hepcidin in the liver recapitulates the hemochromatotic phenotype." Blood **123**(23): 3646-3650.

Titre : Régulation de l'érythropoïèse : rôle des récepteurs à la transferrine et d'un phytoestrogène

Mots clés : Erythropoïèse, érythropoïétine, transferrine, récepteur à la transferrine, phytoestrogène, *Curcuma comosa*

Résumé : L'érythropoïèse est un processus extrêmement prolifératif, et qui doit donc être très étroitement régulé. L'érythropoïétine (EPO) est l'un des facteurs absolument nécessaires à l'érythropoïèse. Cependant, dans la moelle osseuse, la quantité d'EPO circulante est sous-optimale et la capacité des érythroblastes à survivre dépend donc de leur sensibilité à l'EPO. Les facteurs modulant la réponse à l'EPO au cours de l'érythropoïèse sont encore largement inconnus. Nous avons donc voulu explorer plusieurs facteurs pouvant potentiellement être impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse et plus précisément dans la réponse à l'EPO : tout d'abord, la transferrine ainsi que ses récepteurs (TfR), la transferrine et le TfR1 étant également essentiels à l'érythropoïèse, ainsi qu'un phytoestrogène provenant d'une plante nommée *Curcuma comosa*, les œstrogènes étant eux aussi connus pour favoriser l'érythropoïèse.

Concernant la transferrine, nous avons voulu principalement explorer son rôle sur la signalisation, ayant récemment montré au laboratoire que le TfR1, essentiellement connu pour son rôle dans l'endocytose du fer, est également capable d'entraîner une signalisation.

Nous avons montré que la transferrine potentialise la stimulation induite par l'EPO des voies ERK, AKT et STAT5. Cet effet est conservé même en l'absence d'endocytose du TfR1. Aucune coopération n'a été trouvée entre la transferrine et le stem cell factor (SCF).

Nous avons également observé qu'en l'absence du TfR2, il existe une augmentation de l'expression de l'EPO-R et de la signalisation induite par l'EPO, sans impact de la transferrine dans ce contexte.

Par ailleurs, nous avons montré que le *Curcuma comosa* améliore la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythroïdes précoces, par un mécanisme de potentialisation de la signalisation induite par l'EPO impliquant le récepteur aux œstrogènes ER- α .

En conclusion, la transferrine et ses récepteurs, ainsi qu'un phytoestrogène et l'ER- α , sont impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse via leur action sur la signalisation induite par l'EPO. L'approfondissement de ces données pourrait ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques dans le traitement de l'anémie.

Title : Regulation of erythropoiesis: the role of transferrin receptors and a phytoestrogen

Keywords : Erythropoiesis, erythropoietin, transferrin, transferrin receptor, phytoestrogen, *Curcuma comosa*

Abstract : Erythropoiesis is an extremely proliferative process and must be very closely regulated. Erythropoietin (EPO) is one of the major factors necessary for erythropoiesis. However, in the bone marrow, the amount of circulating EPO is suboptimal and the ability of erythroblasts to survive therefore depends on their sensitivity to EPO. The factors modulating the response to EPO during erythropoiesis are still largely unknown.

We therefore wanted to explore several factors that could potentially be involved in the regulation of erythropoiesis and more specifically in the response to EPO: first, transferrin and its receptors (TfR), transferrin and TfR1 being also essential for erythropoiesis, as well as a phytoestrogen from a plant called *Curcuma comosa*, as estrogens are also known to promote erythropoiesis.

Regarding transferrin, we mainly wanted to explore its role on signaling, having recently shown in the laboratory that TfR1, essentially known for its role in iron endocytosis, is a signaling-competent receptor.

We have shown that transferrin potentiates EPO-induced stimulation of the ERK, AKT and STAT5 pathways. This effect is maintained even in the absence of TfR1 endocytosis. No cooperation was found between transferrin and stem cell factor (SCF).

We also observed that in the absence of TfR2, there is an increase in EPO-R expression and EPO-induced signaling, without any impact of transferrin in this context.

In addition, we have shown that *Curcuma comosa* improves the proliferation and differentiation of early erythroid progenitors through a mechanism involving the ER- α estrogen receptor, able to potentiate EPO-induced signaling.

In conclusion, transferrin and its receptors, as well as a phytoestrogen and ER- α , are involved in the regulation of erythropoiesis through their action on EPO-induced signaling. Further investigation of these data could provide new therapeutic strategies in the treatment of anemia.