Rôle de l'AMPK au cours de l'érythropoïèse murine et humaine

Meriem Ladli

▶ **To cite this version:**

Meriem Ladli. Rôle de l'AMPK au cours de l'érythropoïèse murine et humaine. Hématologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017USPCB089 . tel-03847623

HAL Id: tel-03847623
https://theses.hal.science/tel-03847623

Submitted on 10 Nov 2022

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.

Thèse de doctorat de l'Université Paris Descartes (Paris V)

Ecole doctorale Hématologie, Oncogenèse et Biothérapies (HOB)

Spécialité Hématologie

Soutenue publiquement le 29 novembre 2017 à l'Institut Cochin par :

Meriem LADLI

Rôle de l'AMPK au cours de l'érythropoïèse murine et humaine

Directeur de thèse

Frédérique Verdier

Jury de thèse

Pr. Emmanuel Gyan	Rapporteur
Pr. Loïc Garçon	Rapporteur
Dr. Isabelle Plo	Examinateur
Dr. Arnaud Jacquel	Examinateur
Dr. Benoit Viollet	Examinateur

I. Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci à mes rapporteurs, le **Pr. Loïc Garçon** et le **Pr. Emmanuel Gyan** pour le temps qu'ils ont accordé à la correction de mon manuscrit de thèse. Je remercie aussi le **Dr. Isabelle Plo** et le **Dr. Arnaud Jacquel** d'avoir accepté le rôle d'examinateur. J'aimerais remercier le **Dr. Benoit Viollet** qui me fait l'honneur d'être président du jury de thèse. Je te remercie également de ta contribution à ce travail, ta disponibilité, ton aide et ta gentillesse.

Fred, je ne te remercierai jamais assez de m'avoir donné la chance d'atteindre mon objectif. Merci pour la confiance que tu m'as accordée durant ces 5 années, tu m'as beaucoup soutenue et aidée professionnellement et personnellement. Ta gentillesse et tes qualités humaines m'ont beaucoup marquée.
Merci d'avoir dirigé ce projet, merci également pour tous les congrès auxquels tu m'as fait participer et qui ont été pour moi très formateurs.

Je remercie le **Dr. Patrick Mayeux**, le **Pr. Catherine Lacombe** de m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Je vous remercie aussi de vos conseils lors des réunions.

Yael, je te remercie de ton aide et tes conseils sur le projet. Merci pour ta gentillesse, tu m'as beaucoup soutenue et encouragée durant ces années (notamment par tes, tu vas réussir tu vas réussir j'en suis sûre).

Sarah, un grand merci pour tes qualités pédagogiques (sauf quand tu pars dans tes exemples…un peu ratés :) et pour tout ce que tu m'as appris. Merci d'avoir été toujours présente pour moi quand j'avais besoin de toi et tu continues à l'être même en étant loin. Merci pour les heures passées sur skype à m'aider, m'encourager et me remonter le moral dans les moments difficiles ;). Je suis triste que tu ne puisses pas être présente le jour de ma soutenance.

Merci à ma co-thésarde **Cyrielle** pour ta disponibilité et ton aide précieuse pour les manips durant les mois de rédaction. Merci pour ta gentillesse et ta patience, je sais que je t'ai beaucoup sollicitée ces derniers temps pour Graphpad, la traduction, le PC qui bug et la liste est encore longue. Merci pour tout et bon courage pour la suite.

Lilia, je te remercie de ta gentillesse, ton aide et ta précieuse participation au projet.

Je tiens à remercier le **Dr. Francine Coté** de son aide, sa disponibilité et ses nombreux conseils qui nous ont aidés à mettre au point la culture d'érythroblastes murins.

Je remercie également les étudiantes que j'ai eu le plaisir d'encadrer, **Sarah et Isaline**. Merci pour votre participation au projet, je vous souhaite beaucoup de réussite pour la suite.

Un énorme merci à toi **Lamya** pour ton soutien moral :), ta gentillesse et surtout pour la patience que tu as eue pour écouter mes histoires « compliquées ». Tu as toujours su trouver les mots pour me remonter le moral et m'encourager ou m'emmener au resto quand les mots ne suffisaient plus☺. Rien n'aurait été pareil sans toi. Tu vas beaucoup me manquer.

Carine un énorme merci pour ta gentillesse, pour tout le temps que tu as consacré à la correction de mon manuscrit, au labo, chez toi le weekend et même dans le train… Je tiens à saluer ta faculté surnaturelle à détecter les doubles espaces !

Flower, mon encyclopédie, bien que tu sois énormément sollicitée et débordée, tu as toujours trouvé le temps pour m'aider et répondre à mes questions je te remercie pour tout. Merci pour ta gentillesse et ton grand cœur, je te souhaite le meilleur dans ta vie personnelle et professionnelle.

Gab, je te remercie pour ta gentillesse, ton aide et ta disponibilité. Bon courage pour cette dernière année.
Sophie, je suis contente de t'avoir rencontrée, ton caractère de feu a animé mon quotidien ces quelques mois. Je te souhaite plein de belles choses pour la suite.
Alice ma binôme de responsabilités et de ménage, merci et désolée pour toutes les fois où tu as dû me le rappeler 3 fois par semaine !! ☺. Merci pour la secrète santa box et tout ce que tu fais au labo.
Reem, je suis heureuse de t'avoir connue, j'espère que tu vas continuer à me donner de tes nouvelles. Bon courage pour ta thèse, c'est une belle expérience.

Un grand merci à **mes manchots du bureau 718** sans qui la recherche aurait été moins fun.
Nous avons passé de bons moments entassés dans ce bureau à longueur de journées. J'ai beaucoup appris de nos discussions pas toujours très scientifiques mais toujours très intéressantes...

Pierre, nous avons commencé cette belle expérience en même temps et on la finit à un jour d'écart. Je te remercie, pour ton amitié, ton soutien et pour tout ce qu'on a pu partager, surtout les mois de rédaction. Je te souhaite plein de belles choses pour la suite.

Adrien, merci pour la bonne humeur que tu as apporté au labo, ne change surtout pas, tu es une personne formidable. Je penserai à tes sages paroles avant ma soutenance pour déstresser ;)
Gogod, c'est triste que tu sois partie, ton humour et tes discussions manquent au bureau. Bon courage pour ton nouveau poste.
Juju je te remercie pour ta gentillesse et pour toutes les consultations privées au 7 ème à chaque fois que j'ai mal (c-à-d tous les jrs pendant la rédaction :)

Ma girl team, je ne sais pas ce que j'aurais fait sans vous les filles. Merci pour toutes ces choses qu'on a pu partager. Merci pour votre amitié vous allez beaucoupppppp me manquer.
Salomette, je suis contente d'avoir fait ta connaissance, tu m'as permis de voir les choses autrement ! Ta sensibilité et ta fragilité m'ont beaucoup touchée. Ça me ferait tellement plaisir que tu sois présente en juillet, je t'attendrai, alors j'espère que tu vas le prendre cet avion !

Sabrinouche (appelée aussi bibi ;) ça m'avait touché quand tu avais dit que c'est vrai que nous sommes seules ici sur Paris mais qu'à nous 4 on forme une petite famille, parce que c'est ainsi que je vous considère. Je te remercie pour ce que tu es, dommage que tout le monde ne soit pas comme toi, on aurait vécu dans un monde de paix. Merci pour notre petite balade en bateau mouche, nos ciné et de m'avoir fait découvrir le paradis du fruit, je garde de très bons souvenirs de nos petites sorties.
Ma fettoucheeee, j'ai ressenti une grande joie quand tu es arrivée au labo, avant même de te connaître… aujourd'hui je veux te remercier de ta belle amitié, tu es une personne qui compte beaucoup pour moi. Merci pour les longues heures que tu as passé à m'écouter raconter « ma vie ». Tu me comprends tellement bien, même si tu n'es pas toujours de mon côté :(tes 2 semaines de vacances me paraissent une éternité alors me dire que je ne vais plus te voir à partir de février… je ne veux pas y penser…. Je te souhaite tout le bonheur du monde ma fetfet (et un crispr FLT3 qui marche ;).

Je voudrais te remercier **Mamia** et remercier ta famille pour votre aide durant ces 7 années. Votre présence m'a été très précieuse. Je vous remercie pour tout.

Tata Yamina, j'étais très touchée par ta bienveillance, ton soutien et tes encouragements qui m'ont aidée à avancer. Je te remercie.

Mon oncle et ma tata, je tiens à vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi depuis le premier jour. Sans votre présence, votre gentillesse et votre soutien je pense que j'aurais abandonné la première semaine ! Vous êtes une famille formidable, je vous adore. Merci aussi à mes cousins et surtout à toi Anis pour ta gentillesse et ton grand cœur, 1ans à dormir dans le salon pour me laisser ta chambre, il n'y a pas grand monde capable de faire ça!

Sadek, un énorme merci pour tous les sacrifices que tu as fait pour moi. Merci pour ta présence, ton soutien et ta patience durant ces années, je sais qu'elles furent difficiles mais je te remercie d'avoir contribué à ma réussite.

Et enfin j'adresse ma gratitude à **mes parents** sans qui rien de cela n'aurait été possible. Je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi depuis toujours, vous êtes la source de ma motivation et mes ambitions. Je vous aime.
Merci à **ma sœur et mon frère**, je vous souhaite toute la réussite possible, un bel avenir et une heureuse vie.

II. Table des matières

I. Remerciements 3

II. Table des matières 6

III. Abbréviations 9

IV. Résumé 11

V. Abstract 12

VI. Introduction 14

A. L'érythropoïèse 14

1. L'hématopoïèse 14

2. Description de l'érythropoïèse au niveau cellulaire 16

a) L'érythropoïèse précoce 17

b) L'érythropoïèse tardive 18

c) La maturation du réticulocyte 27

d) La formation du globule rouge 29

3. Régulation de l'érythropoïèse au niveau moléculaire 32

a) Régulation par les cytokines 32

b) Régulation transcriptionnelle de l'érythropoïèse 37

c) Régulation de l'érythropoïèse par les caspases 38

4. L'érythropoïèse de stress 40

5. Métabolisme énergétique de l'érythropoïèse 42

B. AMPK (AMP-activated protein kinase) 45

1. Structure de l'AMPK 45

2. Régulation de l'activation de l'AMPK 48

a) Activation allostérique de l'AMPK 48

b) Activation de l'AMPK par les kinases en amont 48

c) Inhibition de l'activité de l'AMPK (régulation par les phosphatases) 49

d) Autres régulations de l'activité de l'AMPK 50

e) Activation et inhibition pharmacologique de l'AMPK 51

(1) Les activateurs pharmacologiques de l'AMPK 51

(a) Les activateurs indirects de l'AMPK 51

(b) Les activateurs mimétiques de l'AMP 52

(c) Les activateurs directs 52

(2) Les inhibiteurs pharmacologiques de l'AMPK 54

3. Conséquences de l'activation d'AMPK 55

a) Régulation du métabolisme glucidique et lipidique **55**
(1) Régulation du métabolisme glucidique 55
(2) Régulation du métabolisme lipidique 56
b) Régulation de la croissance cellulaire **56**
(1) Inhibition de la synthèse protéique 56
(a) Régulation de l'initiation de la traduction 57
(b) Régulation de l'élongation de la traduction 58
(2) Régulation du cycle cellulaire 59
(a) Mecanismes regulant le cycle cellulaire 59
(b) Régulation du cycle cellulaire par l'AMPK 60
c) Induction de l'Autophagie **61**
(1) Les mécanismes régulant l'autophagie 61
(2) Régulation de l'autophagie par l'AMPK 63
(a) Régulation de l'autophagie non sélective 63
(b) Régulation de l'autophagie sélective (mitophagie) 65
d) Régulation de la biogenèse mitochondriale par l'AMPK **66**
4. Rôle de l'AMPK dans les cancers **67**
a) Rôle suppresseur de tumeurs de l'AMPK **67**
b) Rôle oncogénique de l'AMPK **68**
c) AMPK cible thérapeutique **69**
5. Rôle de l'AMPK dans la différenciation cellulaire **70**
a) Régulation de la différenciation de divers types cellulaires **71**
b) Régulation de la différenciation des cellules hématopoïétiques **72**
(1) AMPK et cellules souches hématopoïétiques 72
(2) AMPK et différenciation lymphocytaire (lymphocytes T) 73
(3) AMPK et différenciation macrophagique 76
(4) AMPK et globules rouges 77
VII. Objectif **79**
VIII. Résultats (partie I): Rôle de l'AMPK dans l'érythropoïèse murine adulte **81**
IX. Conclusion, discussion et perspectives (partie I) **90**
X. Matériel et méthodes (partie I) **94**
XI. Résultats (partie II): Rôle de l'AMPK dans l'érythropoïèse humaine adulte **99**
A. Résumé de l'article **99**

B. Article 102
XII. Conclusion, discussion et perspectives (partie II) 128
XIII. Références bibliographiques 134
XIV. Annexes 155

III. Abbréviations

4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
ACC	acétyl CoA carboxylase
ADN	acide déoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AICAR	aminoimidazole carboxamide ribonucleotide
AMP	adénosine monophosphate
AMPK	AMP activated protein kinase
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ATF4	activating transcription factor 4
ATG	autophagy related
ATP	Adénosine TriPhosphate
BCL2	B cell lymphoma 2
BFU-e	Burst Forming Units Erythroid
CaMKKβ	calcium/calmodulin dependent protein kinase kinase β
CBM	carbohydrate binding module
CBS	cystathionin- β-synthase
CD	Cluster de différenciation
CD	cluster of differentiation
Cdk	Cyclin-dependant kinase
CFU-e	Colony Forming Units Erythroid
ChREBP	carbohydrate responsive element binding protein
CLP	Progéniteur Commun Lymphoïde
CMP	Progéniteur Commun Myéloïde
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
E	Erythroblaste
eEF	eukaryotic elongation factor
eIF	eukarytic initiation factor
eIF2AK	eIF2A kinase
EPO	Erythropoïétine
EPOR	Récepteur à l'érythropoïétine
ERK	extracellular signal regulated kinase
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
GDP	guanosine diphosphate

GLUT1	glucose transporter 1
GMP	Progéniteur Granulo-Macrophagique
GPA	Glycophorine A
GSK3β	glycogen synthase kinase 3 β
GTP	guanosine triphosphate
HIF1α	hypoxia inducible factor 1α
hTf	holoTransferrine
IL	Interleukine
JAK2	Janus Kinase 2
LC3	microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
MEP	Progéniteur Erythro-Mégacaryocytaire
MGG :	May-Grünwald-Giemsa
MPP	Progéniteur MultiPotent
mTOR :	mammalian Target Of Rapamycin
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
PGC1α	PPAR- γ coactivator 1α
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
ProE	Proérythroblaste
RAPTOR	regulatory associated prote in of mammalian target of rapamycin
ROS	reactive oxygen species
SCF	Stem Cell Factor
TAK1	TGF β activated kinase
TSC1	tuberous sclerosis 1 (hamartin)
TSC2	tuberous sclerosis 2 (tuberin)
ULK1	unc-51-like kinase

IV. Résumé

L'érythropoïèse adulte est un processus complexe qui a lieu dans la moelle osseuse, il aboutit à la formation de globules rouges (GR) à partir des cellules souches hématopoïétiques. L'AMPK (AMP-activated protein kinase) est un complexe hétérotrimérique (αβγ) connu pour son rôle de régulateur du métabolisme énergétique cellulaire. L'implication de l'AMPK dans le maintien de la survie et de l'intégrité des globules rouges murins a été démontrée. En effet, les souris invalidées pour *Ampk α1, β1 ou γ1* présentent une anémie hémolytique due à une anomalie de la déformabilité des globules rouges. Nous avons émis l'hypothèse que les altérations observées dans les érythrocytes déficients en AMPK pourraient se mettre en place au cours du processus de différenciation des érythroblastes. L'objectif de ce travail est donc d'étudier le rôle de l'AMPK au cours de l'érythropoïèse murine et humaine adulte.

Chez la souris, nos résultats démontrent que l'absence de l'AMPK n'affecte ni la prolifération ni la survie ni la différenciation des érythroblastes *Ampkα1*$^{-/-}$. De la même façon, l'activation de l'AMPK n'a pas d'effet sur les érythroblastes murins.

Chez l'homme, nous avons montré par une approche shRNA que l'inhibition de l'expression de la sous-unité α1 de l'AMPK induit un ralentissement de la prolifération cellulaire et une anomalie de l'érythropoïèse révélée par une modification de l'expression des protéines membranaires à la surface des érythroblastes au cours de la différenciation. Nous avons également montré que l'AMPK est fortement activée dans les érythroblastes immatures (Pro-E –Baso-E) et que cette activation diminue dans les érythroblastes matures (Poly-E – Retic). Une activation de l'AMPK par des activateurs directs (GSK621 et 991) dans les érythroblastes immatures n'a pas d'effet. Par contre, le maintien de son activation par les activateurs directs dans les érythroblastes matures induit, un arrêt du cycle cellulaire en phase S, une induction de l'autophagie, une apoptose caspase dépendante conduisant à un arrêt de la différenciation au stade Baso-E. Ces résultats montrent l'importance de la diminution de l'activation de l'AMPK pour la survie et la différenciation des érythroblastes matures.

L'AMPK est donc importante pour la différenciation des cellules érythroïdes humaines alors que chez la souris, elle est impliquée dans le fonctionnement du globule rouge. Notre travail illustre donc un nouveau point de divergence entre l'érythropoïèse murine et l'érythropoïèse humaine.

V. Abstract

AMPK (AMP-activated protein kinase) is a heterotrimeric complex containing α, β, and γ subunits, known for its role in the maintenance of cellular energy homeostasis. It has been shown that Ampk is involved in maintaining integrity of murine RBCs as well as their survival. Indeed, *Ampk α1*$^{-/-}$ and *Ampk γ1*$^{-/-}$ mice present a hemolytic anemia, and their RBCs show elasticity defects in their plasma membrane. We hypothesized that the alterations observed in AMPK-deficient erythroblasts were the results of a lack of Ampk earlier during erythroid differentiation. Therefore, we aim to study the role of AMPK during human and murine erythropoiesis.

We showed that the absence or activation of Ampk in mice does not affect either the survival, proliferation, or the differentiation of KO erythroblasts compared to WT ones.

In human, our data show that the knockdown of the α1 subunit expression by shRNA induces a slowing down of cell proliferation and a dyserythropoiesis, indicated by the shift in pattern of cell surface markers expression during differentiation. In addition, we showed that phosphorylation of AMPK (Thr172) and its target ACC (Ser 79) are elevated in immature (Pro-E –Baso-E) erythroblasts, and then decreased conjointly with the erythroid differentiation. AMPK activation in immature erythroblasts has no effect. Conversely, in mature (Poly-E – Retic) erythroblasts, the persistence of AMPK expression induces a cell cycle arrest in S phase, followed by the induction of autophagy, and of caspase-dependent apoptosis with a differentiation arrest at basophilic erythroblast stage.

Our results demonstrate the importance of finely-tuned regulation of AMPK during adult human erythropoiesis.

AMPK is needed for efficient erythropoiesis in human, whereas it is involved solely in RBCs function in mice, showcasing yet another contrasting point between human and mouse erythropoiesis.

Introduction

VI. Introduction

A. L’érythropoïèse

1. L’hématopoïèse

L’hématopoïèse est un processus actif et hiérarchisé qui permet de générer tous les éléments figurés du sang à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH) présentes dans la moelle osseuse adulte. Ce mécanisme est finement régulé par de multiples facteurs intrinsèques et extrinsèques qui permettent la différenciation en un lignage cellulaire particulier.

Chez la souris comme chez l’homme, le siège de l’hématopoïèse se déplace au cours du développement. Les premières cellules hématopoïétiques apparaissent dans les îlots sanguins du sac vitellin, il s’agit d’une hématopoïèse primitive constituée de progéniteurs érythroïdes, mégacaryocytaires et macrophagiques qui ne possèdent pas de potentiel de reconstitution à long terme. Les érythrocytes primitifs circulants ont la particularité d’être nucléés et peuvent éventuellement énucléer dans la circulation (Kingsley et al., 2004) (Van Handel et al., 2010). A partir du sac vitellin, une deuxième vague d’hématopoièse fait émerger des progéniteurs érythro-myéloides (progéniteurs érythroïdes, mégacaryocytaires, macrophagiques, neutrophiliques et mastocytaires) capables de migrer vers le foie foetal et de participer à une hématopoïèse définitive. Ensuite, au niveau de la région aorte-gonades mésonéphros (AGM), les CSH émergent et sont également à l’origine de l’hématopoïèse définitive. Elles possèdent une capacité d’auto-renouvellement et de reconstitution à long terme de l'hématopoïèse après greffes primaires et secondaires. L’hématopoïèse migre ensuite vers le foie puis se déplace progressivement vers la moelle osseuse. Chez l’homme comme chez la souris, après la naissance, les CSH résident dans la moelle osseuse et sont capables de donner naissance à toutes les cellules hématopoïétiques (Palis, 2016) (Figure 1).

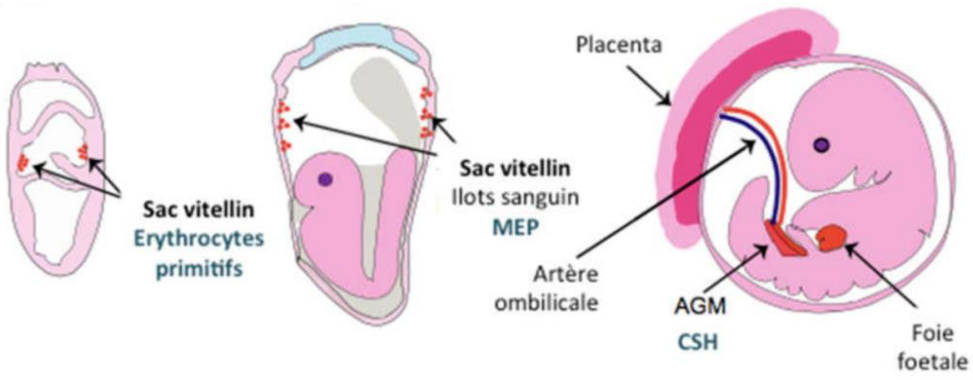


Figure 1 : **les vagues de l'hématopoïèse au cours du développement.**

Adapté de (Nandakumar et al., 2016)

Il existe un modèle classique de la différenciation hématopoïétique (figure 2 flèches noires) selon lequel les CSH se différencient en progéniteurs multipotents (MPP). Ces derniers vont donner naissance à deux types de progéniteurs, les progéniteurs communs lymphoïdes (CLP) et myéloïdes (CMP). Les CLP peuvent produire le progéniteur des cellules T, B, NK (natural killer), et celui des cellules dendritiques**.** Deux progéniteurs bipotents émergent des CMP : les progéniteurs granulomonocytaires (GMP) et les progéniteurs érythro-mégacaryocytaires (MEP). Les GMP produisent les progéniteurs des granulocytes et des macrophages et les MEP produisent les progéniteurs des mégacaryocytes et des érythrocytes.

Des travaux réalisés chez la souris et plus récemment chez l'homme, ont permis d'identifier de nouvelles voies concomitantes ou alternatives à la différenciation hématopoïétique classique et de proposer ainsi un nouveau modèle de l'hématopoïèse (figure 2 flèches rouges). Par des techniques de traçabilité à l'échelle unicellulaire, il a été démontré que les CSH peuvent se différencier en progéniteurs lympho-myeloides (LMPP) capables de produire les GMP et les CLP, et que l'engagement vers la lignée érythroïde ou mégacaryocytaire (MEP) survient directement à partir des CSH (Sanjuan-Pla et al., 2013) (Yamamoto et al., 2013) (Notta et al., 2016). En effet, une analyse transcriptomique à l'échelle unicellulaire des CSH et des progéniteurs a démontré que le profil d'expression génique des progéniteurs érythroïdes ou mégacaryocytaires est proche de celui des CSH et diffère de celui de la lignée lymphoïde supportant ainsi cette hypothèse (Guo et al., 2013). Cependant, environ 85% des MEP s'engagent vers une différenciation érythroïde (Mori et al., 2015). Ainsi, une étude récente a mis en évidence l'existence d'un progéniteur unipotent (MegP) issu directement des CSH et capable de d'engager vers la lignée mégacaryocytaire plus efficacement que les MEP (Miyawaki et al., 2017).

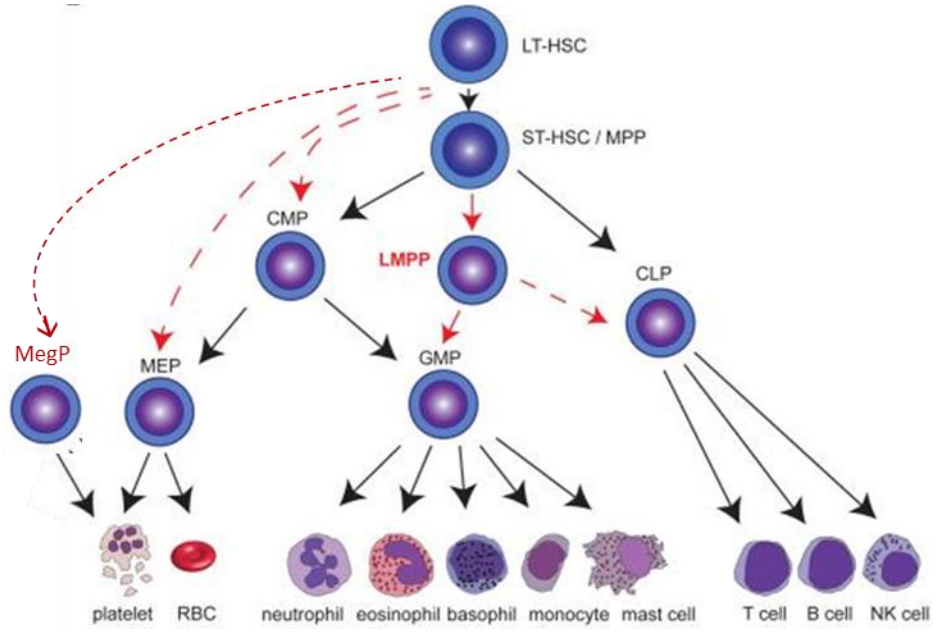


Figure 2 *:* Hématopoïèse adulte humaine et murine (Nandakumar et al., 2016)**.**

Dans le modèle classique (flèches noires), les CSH adultes se différencient en progéniteurs multipotents (MPP) qui vont donner naissance à deux types de progéniteurs : les progéniteurs commun lymphoïdes (CLP) et myéloïdes (CMP). Deux progéniteurs bipotents émergent des CMP : les progéniteurs granulo-monocytaires (GMP) et les progéniteurs érythro-mégacaryocytaires (MEP).
Plusieurs voies alternatives à l'hématopoïèse classique ont été mises en évidence (flèches rouges). Les CSH sont capable de se différencier directement en CMP, en MEP, en LMPP (progéniteur lympho-myeloide) et en MegP (unipotent megakaryocyte progenitor). LT-HSC: long-term CSH, ST-HSC: short-term CSH, RBC: red blood cells.

2. Description de l'érythropoïèse au niveau cellulaire

L'érythropoïèse adulte est un processus complexe qui a lieu dans la moelle osseuse, il aboutit à la formation des érythrocytes ou globules rouges (GR) à partir des cellules souches hématopoïétiques. Le principal rôle des érythrocytes est le transport de l'oxygène des poumons vers tous les tissus de l'organisme grâce à leur contenu en hémoglobine. Les GR représentent environ 80 % du nombre total de cellules du corps humain (Sender et al., 2016). Leur production représente le plus haut rendement du système hématopoïétique, avec un taux estimé à 200 milliards d'érythrocytes produits par jour. En cas de besoins accrus, l'érythropoïèse peut s'adapter et produire 7 à 8 fois plus d'érythrocytes. L'érythropoïèse doit

être finement régulée afin de maintenir un équilibre entre prolifération et différenciation cellulaire puisque tout défaut ou blocage peut conduire à des syndromes myéloprolifératifs, des dysérythropoïèses ou à la transformation leucémique.

L'érythropoïèse est schématiquement divisée en deux phases : une phase précoce de prolifération des progéniteurs érythroïdes et une phase tardive de différenciation des précurseurs érythroïdes.

a) L'érythropoïèse précoce

L'érythropoïèse précoce est la phase au cours de laquelle les progéniteurs communs myéloïdes s'engagent vers le lignage érythroïde. Cela est marqué par la formation des Burst Forming Unit-Erythroid (BFU-E) qui sont les premiers progéniteurs érythroïdes et qui se différencient ensuite en Colony Forming Unit-Erythroid (CFU-E).

Cette phase est caractérisée par une absence de distinction morphologique entre les cellules. Les premières études chez la souris ont permis d'identifier les progéniteurs érythroïdes BFU- E et CFU-E grâce à leur potentiel à former des colonies d'érythroblastes en milieu semi solide après 8-14 jours de culture pour les BFU-E et 2-3 jours pour les CFU-E. Au cours des années suivantes, Eaves et al. ont caractérisé les progéniteurs érythroïdes humains. La majorité des propriétés des progéniteurs érythroïdes humains sont similaires aux murins à l'exception de la période de développement des colonies *in vitro* en milieu semi solide qui est plus longue chez l'homme. Elle est de 7 à 9 jours pour les CFU-E et de 17 à 20 jours pour les BFU-E.

La prolifération et la différenciation des BFU-E nécessitent des facteurs de croissance comme le SCF (Stem Cell Factor) et le GM-CSF (Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor). Les BFU-E expriment peu de récepteurs à l'érythropoïétine (EPO-R) contrairement aux CFU-E dont la survie est hautement dépendante de l'EPO (Gregory and Eaves, 1977, 1978).

Les progrès technologiques comme les approches génomiques, les nouveaux systèmes de culture ainsi que la cytométrie en flux ont permis de mieux comprendre l'hétérogénéité des progéniteurs érythroïdes. Des études chez la souris ont identifié les BFU-E et CFU-E du foie fœtal comme étant c-kit^{+} CD45^{+} Ter119^{-} CD71^{low} et c-Kit^{+} CD45^{-} Ter119^{-} CD71^{high}

respectivement (Flygare et al., 2011) alors que les CFU-E de la moelle osseuse sont caractérisés comme étant Lin^- c-Kit^+ $Sca\text{-}1^-$ IL-$7R\alpha^-$ IL-$3R\alpha^-$ $CD41^-$ $CD71^+$ (Terszowski et al., 2005). Concernant l'identification immunophénotypique des progéniteurs érythroïdes humains, Li et al. ont démontré que les BFU-E sont IL-$3R^-$ GPA^- $CD34^+$ $CD36^-$ et les CFU-E sont IL-$3R^-$ GPA^- $CD34^-$ $CD36^+$. Ces populations donnent naissance à des colonies pures en methyl-cellulose avec un profil d'expression génique distinct en RNAseq. (Li et al., 2014).

Les CFU-E s'engagent ensuite dans la seconde phase de différenciation érythroïde et donnent naissance à des érythroblastes reconnaissables morphologiquement.

b) L'érythropoïèse tardive

La différenciation érythroïde terminale a lieu dans une structure appelée la niche érythroblastique (îlot érythroblastique). Cette structure est constituée d'un macrophage central nourricier entouré d'érythroblastes à différents stades de maturation qui interagissent avec lui via différentes molécules d'adhésion (Figure 3).

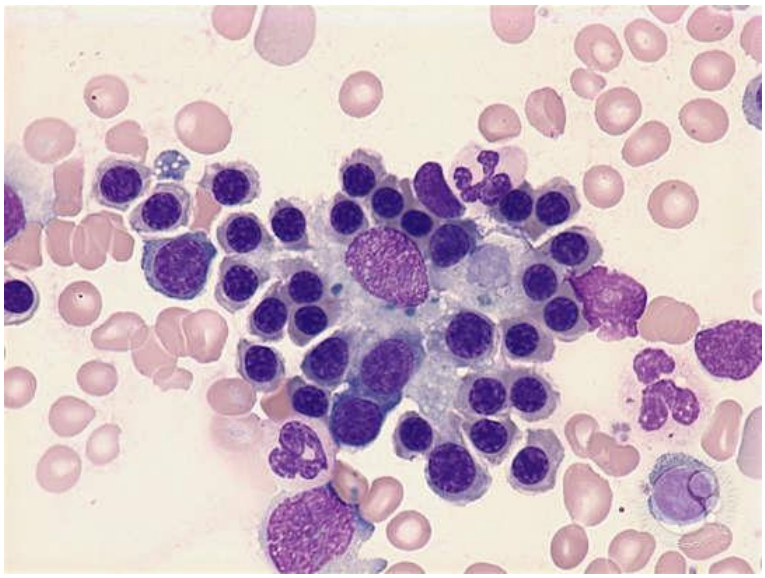


Figure 3 : Niche érythroblastique
Macrophage entouré d'érythroblastes à différents stades de maturation. D'après ashimagebank.qc

Les proérythroblastes (Pro-E) sont les premiers précurseurs érythroïdes morphologiquement identifiables. Ces cellules vont subir une suite de quatre mitoses pour devenir successivement des érythroblastes basophiles (Baso-E) (basophile 1 puis basophile 2 chez l'homme et uniquement basophile 1 chez la souris), des érythroblastes polychromatophiles (poly-E) et des érythroblastes acidophiles (Acido-E) qui vont expulser leur noyau et former des réticulocytes (retic) (figure 4). Ces derniers vont sortir de la moelle osseuse et passer dans la circulation sanguine afin de maturer en érythrocytes (Figure 4).

Des changements morphologiques sont observés au cours de la différenciation et permettent la reconnaissance des différents stades de maturation après coloration des cellules au May-Grünwald-Giemsa (MGG). Nous pouvons observer une réduction progressive de la taille des cellules et des noyaux, une condensation de la chromatine au fur et à mesure de la maturation, un changement de la composition acido-basique du cytoplasme qui est fortement basophile dans les cellules immatures et devient progressivement acidophile grâce à l'augmentation de la synthèse de l'hémoglobine (Figure 4).

Ces changements morphologiques sont accompagnés de changements dans l'expression des marqueurs membranaires qui peuvent être observés par cytométrie en flux (Figure 4).

En effet, chez la souris comme chez l'homme, le récepteur au SCF (c-kit ou CD117) est exprimé dès le stade de CSH et disparaît après le stade proE. Le Ter119 (marqueur de la lignée érythroïde murine) et la glycophorine A (GPA : marqueur de la lignée érythroïde humaine) apparaissent au stade pro-E et augmentent au stade Baso-E pour atteindre leur maximum. Chez l'homme, le CD36 (récepteur des acides gras) est exprimé à partir du stade BFU-E et disparaît après le stade acido-E. L'expression de la Band 3 (protéine membranaire échangeuse d'anions) augmente à partir du stade baso-E et celle de l'integrine-α4 diminue à partir du stade poly-E (Hu et al., 2013). Chez la souris, l'expression du CD44 (molécule d'adhésion) diminue progressivement et drastiquement au cours de la différenciation érythroïde murine (Chen et al., 2009).

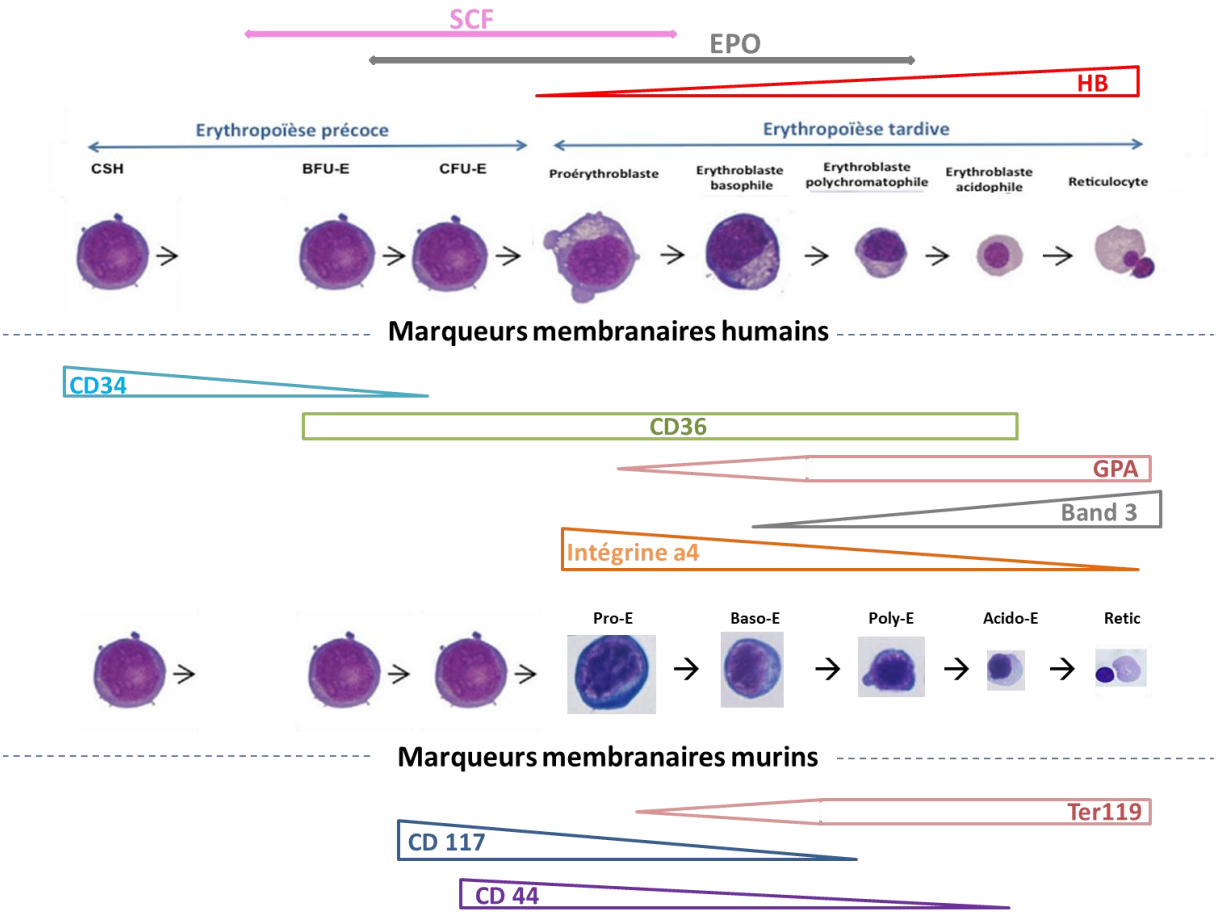


Figure 4 : différenciation érythroïde humaine et murine

L'érythropoïèse se déroule en deux phases : une phase précoce de prolifération des progéniteurs érythroïdes et une phase tardive de différenciation des précurseurs érythroïdes. Elle est régulée par deux principaux facteurs de croissance : le SCF et l'EPO.
Au cours de la phase de différenciation, des changements morphologiques sont observés après coloration MGG. Une augmentation de la synthèse d'hémoglobine est détectée par coloration à la benzidine et un changement d'expression des marqueurs membranaires est observé en cytométrie en flux.
CSH: cellules souches hématopoïétiques**; BFU-E** : Burst-Forming Unit-erythroid; **CFU-E**: Colony-Forming Unit-erythroid; **CD117**: récepteur du Stem Cell Factor; **GPA** : glycophorine A; **MGG**: May-Grünwald-Giemsa. **CD**: Cluster of Differentiation.

Grâce à cette expression différentielle des marqueurs membranaires, plusieurs équipes ont mis au point des stratégies afin de caractériser et isoler les différents stades terminaux de l'érythropoïèse humaine et murine.

Socolovsky et al. ont utilisé l'expression des marqueurs de surface CD71 et Ter119 afin d'isoler par cytométrie en flux les populations d'érythroblastes murins à différents stades de maturation terminale (Socolovsky et al., 2001) (Figure 5A). Cette méthode a été améliorée par la suite grâce à l'utilisation du paramètre de taille des cellules comme marqueur supplémentaire (Liu et al., 2006) .

Plus récemment, l'équipe de Mohandas a démontré l'intérêt de l'utilisation du marqueur membranaire CD44 à la place du CD71. En effet, l'expression du CD44 diminue progressivement et drastiquement au cours de la différenciation érythroïde murine, ce qui permet de mieux distinguer les différents stades terminaux de l'érythropoïèse murine (Chen et al., 2009) (Figure 5B).

La même équipe a également démontré chez l'homme l'intérêt d'utiliser les marqueurs membranaires Band 3 et intégrine-α4 afin d'isoler les différentes populations d'érythroblastes humains par FACS. (Hu et al., 2013) (Figure 5C).

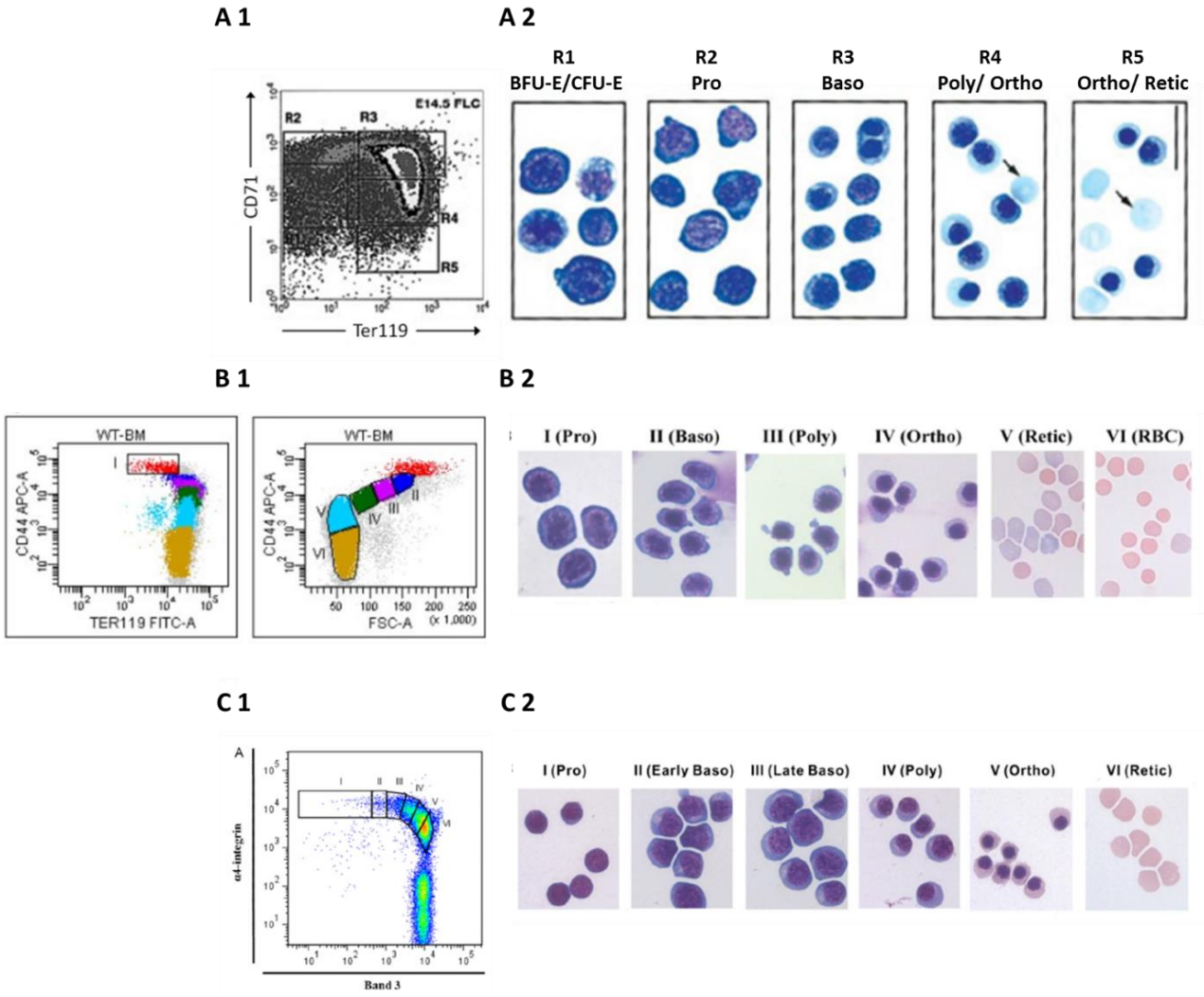


Figure 5: Caractérisation et isolement des stades de l'érythropoïèse humaine et murine par cytométrie en flux.

Isolement des populations d'érythroblastes murins à différents stades de maturation par cytométrie en flux en utilisant les marqueurs membranaires : CD71 et GPA (**A1**) (Zhang et al., 2003). CD44, Ter119 et taille cellulaire FSC-S **(B1)** (Chen et al., 2009)**.** Isolement des populations d'érythroblastes humains à différents stades de maturation par cytométrie en flux en utilisant les marqueurs membranaires Band3 et intégrine α4 (Hu et al., 2013).

A2, B2, C2 : Morphologie des érythroblastes correspondants aux tris après coloration MGG.

Comparaison entre l'érythropoïèse humaine et murine

Il est connu depuis longtemps qu'il existe des différences fondamentales entre l'érythropoïèse humaine et murine. En effet, les érythrocytes humains ont un volume corpusculaire moyen plus élevé (90 vs. 52 fl) une demi-vie plus longue (120 vs. 42 jours) et une affinité à l'oxygène plus élevée (P50 25 vs. 40 mm Hg). D'autres différences entre les érythroblastes humains et murins existent dans la structure et la fonction des protéines membranaires, l'utilisation du glucose, le métabolisme de la vitamine C (Montel-Hagen et al., 2008a), les mécanismes impliqués dans la régulation de l'érythropoïèse de stress (Xiang et al., 2015) et la variation de la composition des gènes de globines (Hardison, 2012).

Comparaison au niveau transcriptomique

En utilisant les nouvelles approches de cytométrie en flux pour trier les différentes populations de précurseurs érythroïdes, An et al. ont réalisé une analyse transcriptomique globale des érythroblastes humains et murins du stade Pro-E au stade acido- E (An et al., 2014). Cette étude a permis de démontrer que chaque stade de différenciation érythroïde est caractérisé par un profil transcriptomique unique, ce qui complète les différences morphologiques évidentes observées entre les différents stades. Ces résultats appuient également le fait que les érythroblastes sont des cellules capables de proliférer et se différencier en même temps puisque la maturation érythroïde est caractérisée par une division cellulaire qui donne deux cellules filles différentes de la cellule mère. Ces observations sont valables à la fois pour la différenciation érythroïde terminale humaine et murine. Cependant, la principale différence est qu'au cours de leur différenciation, les érythroblastes murins subissent une division cellulaire en moins du stade pro-E au stade acido-E par rapport aux érythroblastes humains. En effet, il n'existe qu'un seul stade baso-E chez la souris alors que chez l'homme il en existe deux (Baso1-E et Baso2-E). Ainsi, durant la différenciation érythroïde terminale murine, le ratio des Pro-E : Baso-E : Poly-E : Acido-E est de 1 :2 :4 :8 alors que le ratio des Pro-E : Baso1-E : Baso2-E : Poly-E : Acido-E chez l'homme est de 1 :2 :4 :8 :16.

La comparaison du transcriptome des différentes populations d'érythroblastes humains à celui des murins démontre une similarité dans la tendance globale de l'expression des gènes mais aussi plusieurs différences marquées qui s'ajoutent à celles déjà connues entre l'érythropoïèse humaine et murine.

La différence la plus marquée observée à partir de l'analyse du transcriptome des érythroblastes humains et murins est la diminution de l'expression de la majorité des gènes durant la différenciation érythroïde murine qui n'est pas observée chez l'homme.

En plus des différences globales dans le profil d'expression des gènes, des différences dans l'expression individuelle des gènes ont été observées. Ainsi, de façon intéressante, GDF15, l'un des 25 gènes les plus exprimés dans les érythroblastes humains, n'est pas exprimé chez la souris (An et al., 2014).

D'autre part, bien que l'expression des facteurs de transcription majeurs soit globalement conservée entre les deux espèces, des divergences importantes ont été observées. Par exemple, chez l'homme, SCL/TAL1 est exprimé uniquement dans le stade poly-E et acido-E alors que chez la souris, il est surexprimé plus tôt dans la différenciation, au stade baso-E. Cette différence d'expression peut altérer significativement le profil d'expression des gènes régulés par ce facteur (Pishesha et al., 2014).

Un autre exemple des différences observées entre l'homme et la souris est dans l'expression des gènes codant pour des protéines de la voie de signalisation MAPK (mitogen-activated protein kinase). Il a été observé que le nombre de gènes impliqués dans cette voie ainsi que leur profil d'expression diffèrent au cours de l'érythropoïèse entre les deux espèces.

L'analyse de l'expression des ARNm codant pour les protéines membranaires majeures a démontré un profil d'expression similaire entre l'homme et la souris. Cependant, quelques divergences existent entre les deux espèces. Par exemple, chez l'homme, l'expression des gènes *ACTB* et *TNFRSF1A* codant pour la β-actine et le TNF-R (tumor necrosis factor receptor) respectivement, ne change pas au cours de la différenciation, tandis qu'elle diminue dans les stades tardifs de la différenciation érythroïde murine. De la même manière, l'expression du gène *ADD3* codant pour la protéine γ-adducine augmente au cours de la différenciation des érythroblastes humains mais diminue au cours de la différenciation murine (Pishesha et al., 2014). Ces résultats suggèrent que la composition de la membrane des érythrocytes est globalement conservée entre l'homme et la souris mais qu'elle diffère pour certaines protéines nécessaires au maintien de la membrane des érythrocytes de chaque espèce.

			Erythropoïèse humaine	Erythropoïèse murine
Croissance des progéniteurs érythroïdes		**Formation colonies BFU-e**	14 jrs	7 jrs
		Formation colonies CFU-e	7 jrs	3 jrs
Différenciation des précurseurs		**Différenciation des précurseurs érythroïdes**	15 jrs	3 jrs
		Ratio des pro-e: baso-e: poly-e: acido-e	1:2:4:8:16	1:2:4:8
		Demi-vie des GR	120 jrs	42 jrs
		Erythropoïèse de stress	moelle	rate
Analyse transcriptomique		**Transporteur du glucose**	GLUT4	GLUT1
		Profile transcriptomique global au cours de la différenciation	Variété dans le profil d'expression des gènes	Diminution globale du profil d'expression des gènes
	Expression de facteur de transcription	***SCL/TAL1***	Augmentation de l'expression aux stades poly-E et acido-E	Augmentation de l'expression au stade baso-E
	Expression des protéines membranaires	***ACTB* (Actine)** ***TNFRSF1A* (TNF-R)**	Expression stable au cours de la différenciation	Diminution de l'expression en fin de différenciation
		***ADD3* (γ adducine)**	Augmentation de l'expression du gène	Diminution de l'expression du gène

Tableau 1 : Comparaison entre l'érythropoïèse humaine et murine.

Comparaison au niveau protéomique

Bien que l'étude transcriptomique globale ait permis d'avancer dans la compréhension et l'étude de l'érythropoïèse humaine et murine, elle ne permet pas de faire une corrélation entre l'expression des gènes et la composition en protéines. En effet, le profil d'expression des ARNm au cours de l'érythropoïèse ne reflète pas forcément celui des protéines. C'est le cas par exemple du gène *ADD3* : l'expression de son ARNm augmente au cours de la différenciation érythroïde humaine alors que celle la protéine est très faiblement ou pas

détectée. De la même façon, au cours de la différenciation érythroïde murine, l'ARNm de l'*Add3* diminue alors que la protéine est fortement détectée dans les érythrocytes murins. Ces observations démontrent l'importance de la réalisation d'une étude protéomique afin de compléter l'étude transcriptomique.

Récemment, notre équipe a réalisé une analyse quantitative absolue des protéines exprimées à chaque stade de la différenciation érythroïde humaine par spectrométrie de masse (Gautier et al., 2016a). Cette étude a permis de déterminer l'expression de 6130 protéines du stade BFU-E au stade acido-E, en nombre de copies par cellules. Les protéines identifiées ont pu être regroupées selon leur profil d'expression. Chez l'homme, l'expression de la majorité des protéines diminue au cours de la différenciation érythroïde. Ces protéines sont impliquées dans la régulation de différents processus cellulaires comme la transcription, le métabolisme, le transport intracellulaire, ainsi que la réplication et la réparation de l'ADN. Une quarantaine de protéines augmente de façon significative au cours de la différenciation, incluant, l'Hb, Band 3, le récepteur du glucose SLC2A1 (GLUT1). Un autre groupe comprend des protéines dont l'expression augmente au stade pro-E/ baso1-E puis diminue dans les stades tardifs, incluant, LEPR (leptin receptor) ou IRF6 (interferon regulatory factor 6).

L'analyse de l'expression de l'ensemble des protéines a permis de mettre en évidence une dichotomie entre le stade baso1-E et baso2-E. En effet, il existe des différences majeures dans la constitution cellulaire entre ces deux stades ce qui suggère que le stade baso-E constitue une étape majeure dans la différenciation érythroïde.

La comparaison de l'analyse protéomique à celle de l'analyse transcriptomique a démontré une corrélation modeste entre l'expression des ARNm et celle des protéines dans les érythroblastes au cours de la différenciation érythroïde humaine. Les gènes dont l'expression des ARNm et des protéines est la plus divergente ont été analysés. L'expression des ARNm de ces gènes augmente au cours de l'érythropoïèse alors que celle des protéines diminue. L'analyse de cet ensemble de gènes révèle un enrichissement significatif de gènes identifiés récemment comme faisant l'objet d'une rétention d'introns au cours de l'érythropoïèse (Edwards et al., 2016) (Pimentel et al., 2016). Cela pourrait expliquer en partie la différence qui existe entre l'expression des ARNm et des protéines au cours de la différenciation érythroïde humaine.

On peut par conséquent se demander ce qu'il en est des différences entre l'érythropoïèse humaine et murine au niveau protéomique. Pour évaluer cela, je participe actuellement à une

étude réalisée au laboratoire ayant pour objectif la caractérisation du protéome des cellules érythroïdes murines au cours des différents stades de l'érythropoïèse. Cette étude nous permettra d'approfondir et de compléter notre compréhension de l'érythropoïèse murine et d'affiner la comparaison entre l'érythropoïèse humaine et murine au niveau protéomique.

c) La maturation du réticulocyte

Chez les mammifères, les acido-E expulsent leur noyau pour former les pyrénocytes et les réticulocytes. Les pyrénocytes correspondent aux noyaux entourés de membrane plasmique et d'une petite quantité de cytoplasme. Après expulsion ils sont rapidement phagocytés par les macrophages de la niche érythroblastique (Yoshida et al., 2005). Les réticulocytes sont des cellules anucléées riches en ARNm et contiennent encore des organelles comme les mitochondries, les ribosomes, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Ils sortent de la moelle osseuse et passent dans la circulation sanguine afin de maturer en érythrocytes (Koury et al., 2005). Cette maturation nécessite le réarrangement de la membrane plasmique afin d'augmenter leur déformabilité, une diminution du volume cellulaire, l'acquisition de la forme biconcave ainsi que la dégradation des ARNm qu'ils contiennent et l'élimination des organelles intracellulaires par autophagie sélective. La régulation moléculaire de l'autophagie sera décrite dans le chapitre (B.3.c.1).

Les mécanismes par lesquels les organelles sont éliminées sont longtemps restés inconnus. Ce n'est qu'en 2008 que le rôle de l'autophagie dans l'élimination des mitochondries, la mitophagie, a été mis en évidence grâce à l'étude des souris invalidées pour *Nix* (protéine de la famille Bcl-2) (Sandoval et al., 2008). Au cours de leur maturation, une proportion des réticulocytes de ces souris présentent des défauts dans l'élimination des mitochondries, sans que la dégradation des ribosomes ou des autres organelles ne soit affectée (Schweers et al., 2007). Dans les réticulocytes issus de souris contrôles, les mitochondries sont dépolarisées et localisées à l'intérieur des autophagosomes. Cependant, les réticulocytes issus de souris $Nix^{-/-}$ maintiennent le potentiel membranaire mitochondrial et les mitochondries ne sont pas incorporées efficacement dans les autophagosomes pour être éliminées. L'élimination des mitochondries est restaurée dans les réticulocytes issus des souris $Nix^{-/-}$ dans lesquelles la perte du potentiel membranaire mitochondrial est induite de manière chimique. NIX a donc été suggérée comme étant importante à l'induction de la dépolarisation mitochondriale qui pourrait constituer un signal pour cibler les mitochondries à éliminer. Dans les souris $Nix^{-/-}$,

cette absence de dégradation des mitochondries par mitophagie conduit à la formation de globules rouges déficients qui sont rapidement éliminés ce qui a pour conséquence le développement d'une anémie chez ces souris (Sandoval et al., 2008).

Par la suite, l'importance des gènes spécifiques de l'autophagie comme *Atg7, Ulk1*et *Atg4* dans l'élimination des organelles au cours de la maturation des réticulocytes a été mise en évidence.

L'invalidation constitutive d'*Atg7* étant létale au stade néonatal, des souris invalidées spécifiquement dans le système hématopoïétique ont été générées (vav-atg7$^{-/-}$). Ces souris développent une anémie sévère et leurs réticulocytes présentent des défauts dans l'élimination des mitochondries. Contrairement aux réticulocytes issus de souris *Nix*$^{-/-}$ qui présentent un défaut de rétention des mitochondries dans les autophagosomes, les mitochondries des réticulocytes de souris *vav-atg7*$^{-/-}$ sont retenues dans les pré-autophagosomes. Cependant, l'étape de l'élongation des autophagosomes est affectée, ce qui empêche la dégradation des mitochondries (Mortensen et al., 2010).

De façon similaire aux souris *Nix*$^{-/-}$ et *Atg7*$^{-/-}$, les souris *Ulk1*$^{-/-}$ sont anémiques. De plus leurs réticulocytes présentent non seulement des défauts dans l'élimination des mitochondries mais aussi des ribosomes et des ARNm (Kundu et al., 2008).

Dans les modèles murins invalidés pour *Nix, Atg7* et *Ulk1*, l'élimination des mitochondries n'est pas complètement affectée suggérant l'existence d'une voie alternative impliquée dans ce processus. L'implication de la protéine Rab9a (normalement impliquée dans le trafic entre l'endosome tardif et le lysosome) a été mise en évidence. En effet, dans les cellules érythroleucémiques K562 dont le gène *Atg7* a été délété par la technologie crispr/cas9 ainsi que dans les réticulocytes issus de souris invalidées pour *Atg7* ou *Ulk1,* il a été démontré que l'élimination des mitochondries se fait par autophagie non canonique dépendante de Rab9a (Wang et al., 2016a).

Une autre étude a démontré, en utilisant un modèle de différenciation érythroïde humaine *ex vivo,* que l'autophagie est induite à partir du stade poly-E et que cette stimulation d'autophagie est concomitante avec l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans ce processus, dont les membres de la famille ATG4 (ATG4A - ATG4D). De plus l'expression d'un dominant négatif d'ATG4 (ATG4B^{C47A}, ATG4D^{C114A}) induit des défauts dans l'assemblage des autophagosomes particulièrement dans les érythroblastes ATG4B$^{C47A.}$

D’autre part, une accumulation d’amphisomes (vacuoles autophagiques formées par la fusion de l’autophagosome et de l’endosome) non dégradables, a été observée par microscopie électronique. Ces résultats suggèrent un rôle des membres de la famille ATG4 et particulièrement ATG4B dans le contrôle de la fusion de l’autophagosome avec les compartiments tardifs de dégradation au cours de la différenciation érythroïde humaine (Betin et al., 2013).

d) La formation du globule rouge

La maturation des réticulocytes donne naissance à des cellules anucléées dépourvues de tout organite intracellulaire appelées, globules rouges (GR), érythrocytes ou hématies. Le tiers de la masse totale du GR est constitué d’hémoglobine, ce qui lui permet d’assurer sa fonction de transport d’oxygène des poumons vers tous les tissus de l’organisme. Le globule rouge a une forme biconcave et possède un excédent de surface de 40% comparé à une sphère de même volume. Cela lui permet de se déformer pour passer dans la microcirculation. Les érythrocytes normaux ont une taille et une forme homogène, toute variation qui compromet la capacité des cellules à se déformer induit leur élimination prématurée par la rate.
Cette caractéristique unique du globule rouge lui permettant de se déformer de façon réversible et de répondre aux contraintes de la circulation sanguine est due à l’organisation structurelle de sa membrane (pour revue (Mohandas and Gallagher, 2008)).

(1) Composition de la membrane du globule rouge

La membrane des globules rouges est actuellement considérée comme une structure composée d'une membrane plasmique ancrée grâce aux protéines transmembranaires à un réseau protéique bidimensionnel qui constitue le squelette membranaire.
Plus de 50 protéines transmembranaires ont été identifiées dans le globule rouge. Les protéines les plus étudiées portent les antigènes des différents groupes sanguins comme: Band3, la GPA, GPC, Rh, Rh-associated glycoprotein (RhAG), XK, Kell, Duffy, CD44, CD47, l’aquaporine 1 (AQP1), Lutheran (Lu) et ICAM-4 (intracellular adhesion molecule-4) (Reid and Mohandas, 2004). Ces protéines présentent des fonctions distinctes. Lu, CD44, ICAM-4 ainsi que les intégrines α4β1 et α5β1 permettent l’adhésion cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire. Certaines protéines transmembranaires fonctionnent comme des transporteurs ou des pompes. Il s'agit notamment du transporteur d'eau AQP1, les

transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT4, l'échangeur de sodium / hydrogène NHE1, Na / K-ATPase et le transporteur de gaz RH/RhAG. BAND 3 a un rôle d'échangeur d'anions, et Duffy est un récepteur aux chimiokines (Chaudhuri et al., 1994). Certain de ces transporteurs membranaires ont un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du volume érythrocytaire *via* la régulation de leur teneur en eau et en sel. En effet une implication du méchanotransducteur PIEZO1, du canal calcique GARDOS, de RhAG (Rh-associated glycoprotein), de ABCB6 (ATP-binding cassette family member), de GLUT1et de BAND3 a été démontrée (Gallagher, 2017).

La spectrine est la protéine la plus abondante du cytosquelette membranaire, elle est cruciale pour le maintien de la stabilité membranaire érythrocytaire. Elle est formée de deux chaines, α et β qui s'associent entre elles pour former un hererotétramère. La spectrine interagit avec les autres protéines du cytosquelette comme la protéine 4.1R, l'adducine, la dematine, la tropomyosine et la tropomoduline.

Le réseau de spectrine est attaché à la bicouche lipidique par des interactions protéine-protéine entre les protéines transmembranaires et les protéines du cytosquelette au niveau de deux sites majoritaires (Figure 6).

Le premier site d'interaction implique la protéine ankyrine R qui interagit avec le domaine cytoplasmique de Band 3 et de RhAG et forme ainsi **le complexe ankyrine R** (Bruce et al., 2003). Ce complexe macromoléculaire contient également la protéine 4.2, GPA, RhAG, Rh, CD47 et ICAM-4.

Le second site implique la protéine 4.1R qui s'associe avec GPC, p55, Duffy, XK et la protéine Rh pour former **le complexe 4.1R** au niveau du complexe jonctionnel spectrine-actine (Salomao et al., 2008). Des études récentes ont démontré que 4.2, Band 3 et GLUT1 sont également localisés au niveau du complexe jonctionnel (4.2 par interaction avec l'α-spectrine (Korsgren et al., 2010), Band3 par interaction avec l'adducine (Anong et al., 2009) et GLUT-1 par interaction avec l'adducine et la dématine (Khan et al., 2008).

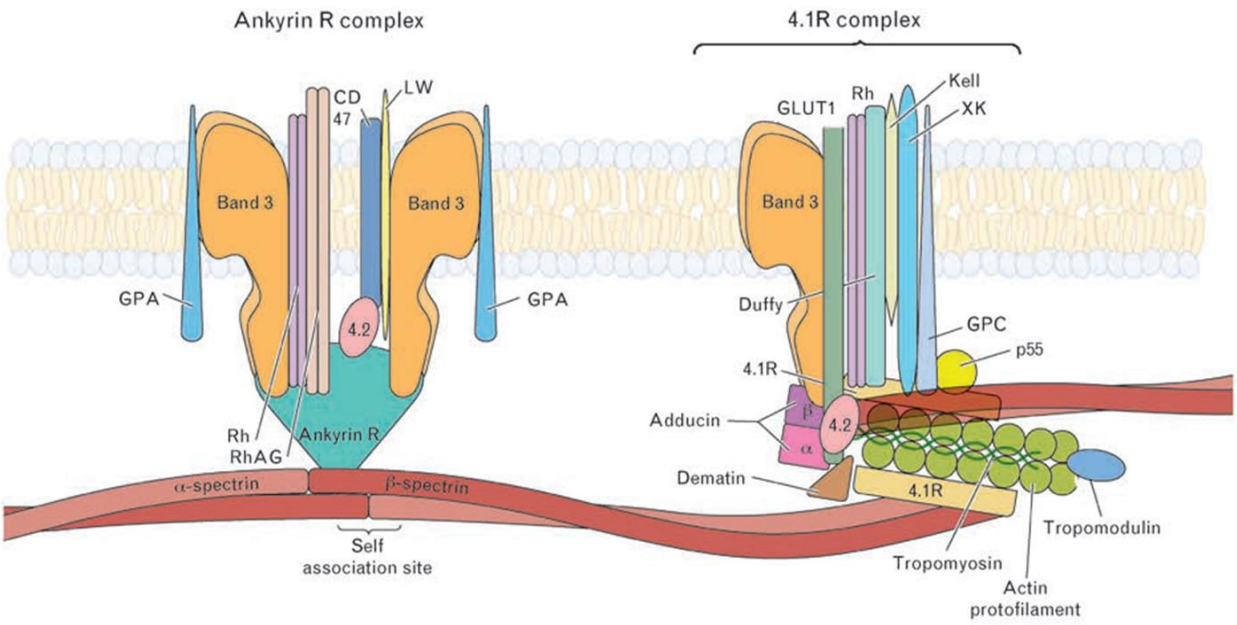


Figure 6: Les complexes membranaires des érythrocytes (Liu et al., 2011)

(2) Changements moléculaires entre le réticulocyte et l'érythrocyte

L'analyse par western blot et cytométrie en flux de l'expression des protéines membranaires entre les réticulocytes et les érythrocytes murins démontre que durant la maturation des érythrocytes, l'expression de la tubuline, l'actine cytosolique, le CD71 et l'ICAM-4 est perdue. Alors que celle de la myosine, la tropomyosine, l'adducine, GLUT4, Na/K-ATPase, NHE1, GPA, CD47, Duffy et Kell est diminuée. En revanche, l'expression de Band 3, Rh, RhAG, GPC et XK semble augmenter après la maturation. L'expression des protéines majeures du cytosquelette, α-spectrin, β-spectrin, ankyrin R, 4.1R, 4.2, p55, tropomoduline et 4.9 n'est pas modifiée (Liu et al., 2010).

L'étude de l'interaction entre les protéines membranaires démontre que même s'il n'y a pas de différence dans la formation des tétramères de spectrines entre les réticulocytes et les érythrocytes, les jonctions entre les spectrines, l'actine et 4.1R sont plus faibles dans les réticulocytes. De plus, la liaison des protéines GPC, XK, Kell, et Duffy à la membrane du cytosquelette est plus faible dans les réticulocytes. Ces faibles interactions semblent être dues en partie à la phosphorylation de 4.1R dans les réticulocytes (Gauthier et al., 2011). Ces résultats donnent un nouvel aperçu des mécanismes impliqués dans les changements structuraux qui accompagnent la maturation des réticulocytes. Les

différents changements moléculaires observés pendant la maturation des réticulocytes murins sont résumés dans le tableau 2.

Perte	Diminution	Pas de changement	Augmentation
Tubuline	Myosine	a-spectrine	Band 3
Actine cytosolique	Tropomyosine	b-spectrine	Rh
TfR1 (CD71)	Adducine	actine associée à la	Rh AG
ICAM-4	GLUT4	membrane	GPA (ter119)
	Na-K-ATPase	Ankyrine R	GPC
	NHE1	4.1R	XK
	GPA	4.2	
	CD47	P55	
	Duffy	Tropomoduline	
	Kell	4.9	

Tableau 2: **Les changements moléculaires durant la maturation des réticulocytes** (Liu et al., 2011).

3. Régulation de l'érythropoïèse au niveau moléculaire

a) Régulation par les cytokines

Plusieurs cytokines et facteurs de croissance ont un rôle important dans la régulation de l'érythropoïèse. Les deux principaux facteurs de croissance sont le stem cell factor (SCF) et l'érythropoïétine (EPO).

(1) Le SCF et son récepteur c-KIT

Le SCF est une cytokine produite de façon ubiquitaire par les cellules stromales de la moelle osseuse. Son action est possible via l'interaction avec son récepteur c-KIT. Il a un rôle dans la survie et la prolifération des progéniteurs érythroïdes BFU-E et CFU-E.

Il existe deux isoformes du SCF qui résultent d'un épissage alternatif de l'ARNm. L'isoforme soluble est rapidement clivée au niveau d'un site protéolytique entraînant la perte du domaine transmbranaire de la protéine. L'isoforme transmembranaire quant à elle, est dépourvue du site de clivage car l'exon codant pour ce site est perdu lors de l'épissage alternatif. (Brannan et al., 1991) (Anderson et al., 1990). Ces deux isoformes sont capables d'activer le récepteur c-KIT, cependant la forme membranaire induit une activation prolongée du récepteur

comparée à la forme soluble. De plus, *in vivo* la forme membranaire semble être importante pour la régulation de l'érythropoïèse puisque les souris n'exprimant que la forme soluble dans les CSH présentent une anémie sévère (Kapur et al., 1999). Le récepteur au SCF est exprimé par les érythroblastes mais également par les progéniteurs hématopoïétiques myéloïdes, les mastocytes, les polynucléaires éosinophiles et les cellules NK (Natural Killer) (Uoshima et al., 1995).

c-KIT appartient à la famille des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase. La liaison du SCF à son récepteur induit sa dimérisation et un changement conformationnel permettant l'autophosphorylation de résidus tyrosine spécifiques présents dans le domaine intracellulaire, conduisant ainsi à l'activation du récepteur (Finger et al., 2009). Ces phosphotyrosines sont reconnues par des protéines dotées de domaines de liaison SH2 (SCR homology domain 2) et PTB (phosphotyrosine binding) permettant ainsi l'activation des voies de signalisation telles que la voie PI3K/AKT et la voie des MAPKinases. L'activation des voies de signalisation en aval de c-KIT promeut la survie et la prolifération cellulaire des progéniteurs érythroïdes (Munugalavadla and Kapur, 2005) (Figure 7).

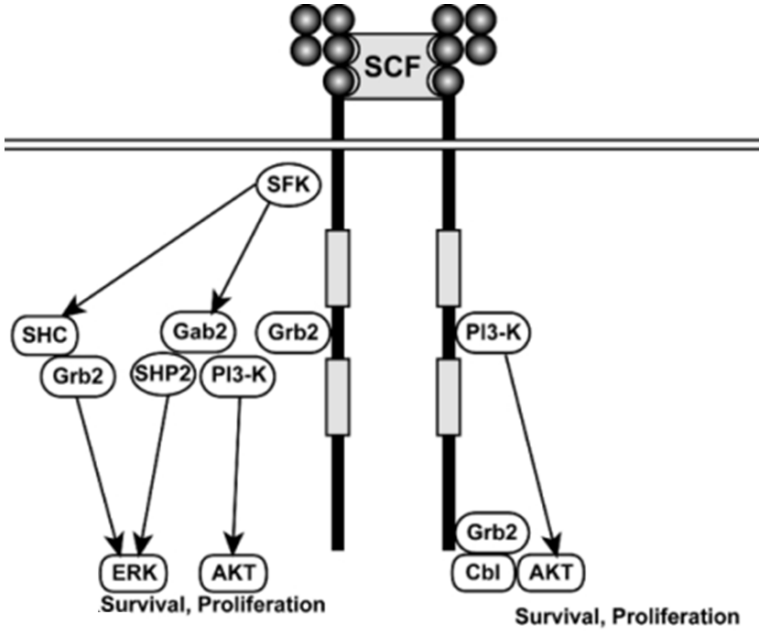


Figure 7 : **les voies de signalisations activées par c-KIT en réponse à une stimulation par le SCF**. (Gabbianelli and Testa, 2009)

(2) L'EPO et son récepteur l'EPOR

L'érythropoïétine est le stimulateur principal de l'érythropoïèse. C'est une glycoprotéine de 34 kDa produite principalement par le rein et dans une moindre mesure par le foie. Elle agit au niveau de la moelle osseuse afin de promouvoir la survie et la prolifération des précurseurs érythroïdes, favorisant leur différenciation et par conséquent une augmentation de la production des globules rouges.

La production d'EPO est régulée au niveau transcriptionnel par le taux d'oxygène fourni aux organes par les globules rouges. En effet, en condition d'hypoxie, la sous-unité HIFα (Hypoxia Inducible Factor) est stabilisée et transloquée dans le noyau ou elle se lie à la sous-unité HIFβ au niveau de la séquence HRE ((Hypoxia Response Element). Cela permet de recruter d'autres cofacteurs permettant ainsi la transcription de l'ARNm de l'EPO et l'augmentation de la production des érythrocytes. En condition de normoxie, HIFα est hydroxylée par des prolyl-hydroxylase (PHD) ce qui va induire son ubiquitinylation par un complexe E3-ligase puis sa dégradation par le protéasome, diminuant ainsi la production d'EPO.

L'EPO agit via la liaison à son récepteur, l'EPO-R. Celui-ci est exprimé à la surface des progéniteurs érythroïdes dès le stade BFU-E. Son expression est maximale aux stades CFU-E /Pro-E puis diminue progressivement au cours de la différenciation terminale. Chez les souris invalidées pour l'*Epo* ou l'*Epo-R,* les BFU-E sont les seuls progéniteurs érythroïdes observés, démontrant l'importance de la signalisation EPO-R pour la survie, la prolifération et la différenciation érythroïde terminale des CFU-E (Wu et al., 1995).

L'EPO-R est une glycoprotéine transmembranaire qui appartient à la famille des récepteurs de cytokines de type 1. Ces récepteurs sont caractérisés par l'absence d'activité enzymatique endogène, ils transduisent un signal intracellulaire grâce à leur interaction constitutive avec les tyrosines kinases JAK (Janus Kinase) (Neubauer et al., 1998).

L'EPO-R est exprimé à la surface des cellules sous forme d'homodimère. La fixation de son ligant EPO va induire un changement de conformation (Remy et al., 1999), permettant le rapprochement des protéines JAK2. Celles-ci vont être activées par trans-phosphorylation puis induire la phosphorylation des résidus tyrosines présents au niveau du domaine intracellulaire de l'EPO-R, ce qui va initier la signalisation en aval de l'EPO-R.

Trois voies de signalisation majeures sont activées par l'EPO : la voie STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription), la voie PI3-K/AKT (Phosphatidyl Inositol3 kinase /Protein Kinase B) et la voie MAPK (mitogen-activated protein kinase) **(Figure 8)**.

Les facteurs de transcription STAT5 sont une cible directe de JAK2. Ils se trouvent à l'état latent dans le cytoplasme des cellules. Suite à l'activation de l'EPOR, STAT5 A et B sont phosphorylés par JAK2, ce qui induit leur homodimérisation et leur translocation dans le noyau. Ils sont impliqués dans la transcription de gènes contrôlant la prolifération des progéniteurs érythroïdes et leur survie comme Bcl-xL (Socolovsky et al., 1999).

La voie PI3K/AKT est activée par l'EPO afin de réguler la survie et la prolifération des progéniteurs érythroïdes (Bouscary et al., 2003). La PI3-K est composée de deux sous-unités : la sous-unité régulatrice P85 et la sous-unité catalytique P110. L'hétérodimère P85/P110 transforme le PIP2 en PIP3 (Phosphatidyl Inositol Phosphates) qui permet le recrutement de la serine/thréonine kinase AKT à la membrane plasmique. AKT est par la suite activée par phosphorylation de sa sérine 473 par la PDK-1(Phosphoinositide-dependent kinase-1) et sa thréonine 308 par mTORC2 (Mammalian target of rapamycin TOR complex 2) (Hresko and Mueckler, 2005).

La liaison de l'EPO sur son récepteur crée des sites d'ancrage pour les protéines adaptatrices SHC et GRB2 permettant le recrutement du facteur d'échange SOS. Cela permet l'activation de Ras, de Raf puis de MEK. Cette Thr/Tyr kinase phosphoryle et active les MAP kinases. La sous famille ERK 1 et 2 (extracellular signal-regulated kinase) favorise la prolifération des progéniteurs érythroïdes immatures au détriment de leur différenciation terminale (Dazy et al., 2003).

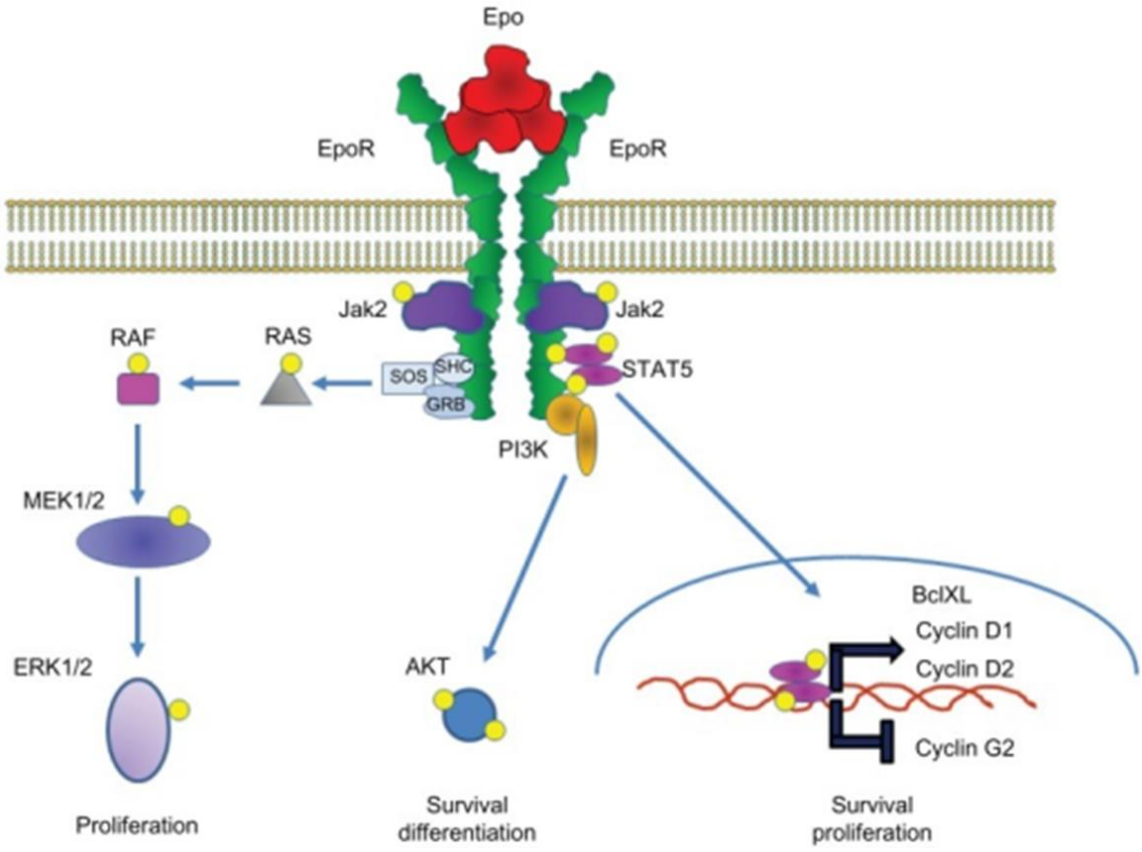


Figure 8 : Les voies de signalisations activées par l'EPO-R en réponse à une stimulation par l'EPO (Elliott and Sinclair, 2012)**.**

(3) Synergie EPO/SCF

Le SCF et l'EPO sont les principales cytokines régulant l'érythropoïèse. Le SCF a un rôle majeur sur les progéniteurs érythroïdes, il permet leur survie et leur prolifération. L'EPO agit sur les progéniteurs et les précurseurs érythroïdes, elle maintient leur survie et permet donc leur différenciation. Bien que ces deux cytokines aient des rôles distincts au cours de l'érythropoïèse, elles peuvent cependant agir en synergie entre elles ou avec d'autres cytokines afin de réguler l'érythropoïèse.

Le SCF et l'EPO peuvent agir en synergie au niveau du récepteur et des effecteurs en aval. Il a été démontré dans la lignée érythroleucémique murine HCD57 dépendante de l'EPO qu'en absence d'EPO, la stimulation de c-KIT par son ligand induit une activation de l'EPO-R en phosphorylant les résidus tyrosine de son domaine intracellulaire (Wu et al., 1995). De façon

réciproque, il a été démontré dans la lignée érythroleucémique UT7 dépendante de l'EPO que l'EPO induit la dimerisation et l'activation de c-KIT en phosphorylant les résidus tyrosine du récepteur (Broudy et al., 1998) (Figure 9).

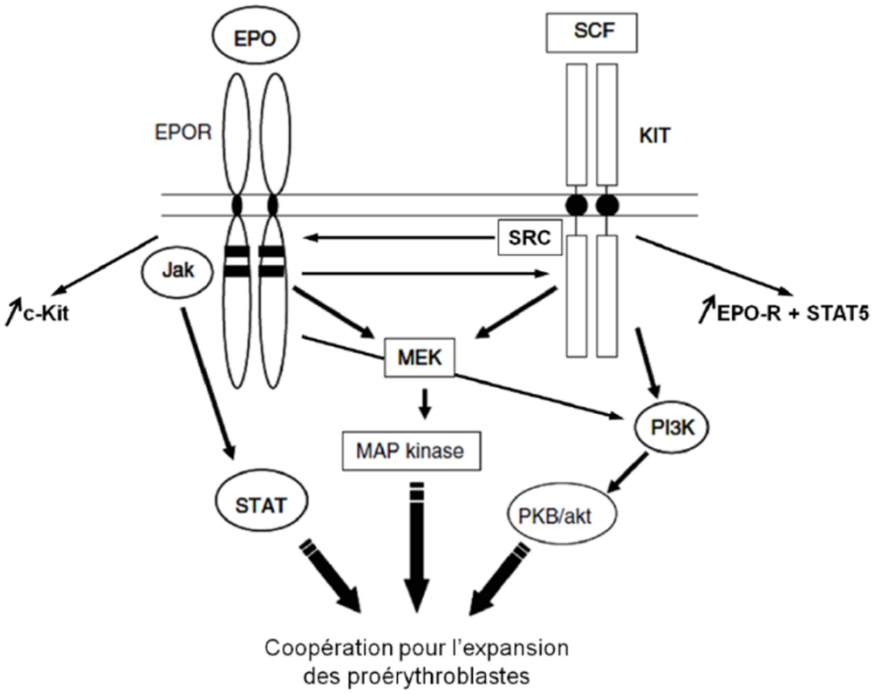


Figure 9 : **voies de signalisations impliquées dans la coopération entre le c-Kit et l'EPO-R**.
Adapté de (Arcasoy and Jiang, 2005)

b) Régulation transcriptionnelle de l'érythropoïèse

L'engagement des progéniteurs multipotents vers la voie érythroïde est contrôlé par des facteurs de transcription majeurs qui régulent finement l'expression des gènes spécifiques de l'érythropoïèse et inhibent les gènes des autres lignages. Un certain nombre de facteurs de transcription conservés ont été identifiés et analysés fonctionnellement dans des cellules hématopoïétiques. GATA1, GATA2, FOG1, KLF1, TAL1, GFI1B, LMO2 et MYB sont les facteurs de transcription majeurs essentiels à la différenciation érythroïde, ils contribuent au control de fonctions cruciales comme la prolifération cellulaire, la survie et la différenciation. Ainsi, leur inactivation induit des défauts majeurs dans l'érythropoïèse. En effet, les embryons de souris *Tal1*$^{-/-}$ meurent in utero à E9 .5 suite à des défauts de l'érythropoïèse primitive (Shivdasani et al., 1995). D'autre part, les souris *Klf1*$^{-/-}$ présentent des défauts de transcription

du gène codant la β-globine et meurent in utero à E15 suite à un défaut de maturation des érythrocytes conduisant une anémie sévère (Shivdasani and Orkin, 1995). Le rôle de GFIB1 est d'empêcher l'activation précoce des gènes impliqués dans la différenciation érythroïde terminale. L'invalidation de Gfib1 spécifiquement dans les cellules érythroïde chez la souris induit une mort post natale par anémie sévère (Saleque et al., 2002). Durant la différenciation hématopoïétique GATA1 a un rôle de régulateur principal dans l'engagement vers le lignage érythroïde via l'inhibition de *GATA2 (*facteur de transcription exprimé dans les CSH) (Suzuki et al., 2013a) et de *PU-1* (Chou et al., 2009) (facteur de transcription impliqué dans la différenciation myéloïde). GATA1 induit également la survie et la différenciation des précurseurs érythroïdes matures en augmentant l'expression de Bcl-xL et en régulant par exemple l'expression des gènes de globine, de la biosynthèse de l'hème et des protéines de la membrane érythrocytaire (GPA et EPOR). Ainsi, l'invalidation de Gata1 chez la souris induit un blocage de la différenciation au stade Pro-E conduisant à une anémie sévère et la mort *in utero.*

Ces facteurs de transcription peuvent agir en complexes afin de réguler l'érythropoïèse. En effet, il a été démontré que GATA1 pouvait former différents complexes avec des facteurs de transcription distincts lui permettant d'agir à la fois comme un activateur ou un répresseur transcriptionnel. En effet, le complexe GATA1/TAL1/LDB1 est principalement considéré comme un complexe activateur alors que le complexe GATA1/GFI1B via son association avec LSD1 histone demethylase est considéré comme complexe répresseur (Rodriguez et al., 2005).

Bien que l'ensemble des complexes régulant l'érythropoïèse soit largement identiques entre l'homme et la souris, les études récentes ont démontré que les sites de liaison à l'ADN occupés par les facteurs de transcription au sein des complexes sont généralement peu conservés ce qui pourrait expliquer les différences dans le profil d'expression des gènes au cours de l'érythropoïèse des deux espèces (Ulirsch et al., 2014) .

c) Régulation de l'érythropoïèse par les caspases

(1) Rôle des caspases dans la régulation positive de l'érythropoïèse

Les changements morphologiques observés au cours de la différenciation érythroïde, comme la diminution de la taille du noyau, la condensation de la chromatine et du cytoplasme ainsi

que la perteF des organites sont similaires à ceux observés au cours du processus apoptotique. Cela suggère l'implication des caspases dans la différenciation érythroïde terminale. En effet, Zermati et al. ont démontré la nécessité d'une activation ponctuelle des caspases pour la maturation des érythroblastes (Zermati et al., 2001). Une inhibition de cette activation par le ZVAD induit un blocage de la différenciation au stade baso-E. Ainsi, l'activation des caspases au cours de l'érythropoïèse induit un clivage de protéines cible comme la lamine B et acinus entrainant respectivement, la condensation du noyau et de la chromatine. Cependant, contrairement à l'apoptose, la protéine ICAD inhibitrice des DNAse, n'est pas clivée au cours de la maturation érythroïde.

(2) Rôle des caspases dans la régulation négative de l'érythropoïèse

Pour éviter une trop forte production de globules rouges, l'érythropoïèse doit être régulée de façon négative. Deux principaux niveaux de régulation semblent exister. D'une part une régulation via la réduction de la production d'EPO lorsque les cellules rénales sont suffisamment oxygénées. D'autre part via un rétrocontrôle négatif impliquant les récepteurs de mort.

Au cours de la différenciation érythroïde terminale, l'EPO induit la survie des progéniteurs via l'activation de la voie STAT5 qui agit en synergie avec GATA-1 pour augmenter l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL. Ainsi, une faible production d'EPO induit une diminution de la synthèse de Bcl-xL conduisant à la dépolarisation de la mitochondrie et l'activation des caspases. D'autre part, BAD n'est plus phosphorylé par la voie PI3K/AKT et se lie à la protéine Bcl-xL contribuant ainsi à l'activation des caspases par la voie mitochondriale et l'induction de l'apoptose des érythroblastes via le clivage de différentes protéines impliquées dans l'érythropoïèse.

Au sein de l'îlot érythroblastique, la régulation négative de l'érythropoïèse peut s'effectuer par un mécanisme faisant intervenir le récepteur de mort Fas exprimé à la surface des érythroblastes immatures et son ligand Fas-L exprimé à la surface des érythroblastes matures, cette voie peut également être activée en réponse à de faibles concentrations d'EPO. L'interaction des érythroblastes les plus matures avec les plus immatures a pour conséquence l'activation de la caspase 8 qui va activer la caspase 3. D'autre part, la caspase 8 va amplifier le signal apoptotique en activant la voie intrinsèque (mitochondriale) de l'apoptose en induisant le clivage de la protéine pro-apoptotique BID en t-BID (De Maria et al., 1999).

GATA 1 est une cible des caspases au cours du processus de différenciation, en présence d'EPO, elle est protégée du clivage grâce à son interaction avec HSP70 au niveau du noyau ce qui permet la différenciation érythroïde terminale. Cependant, en absence d'EPO, HSP70 se délocalise du noyau, GATA 1 n'est donc plus protégée et va être cliveé par les caspases conduisant à l'arrêt de la maturation et l'apoptose des érythroblastes (Ribeil et al., 2007) (Figure 10).

Ainsi, une balance finement régulée existe entre différenciation et apoptose des érythroblastes permettant de contrôler le taux de production des globules rouges.

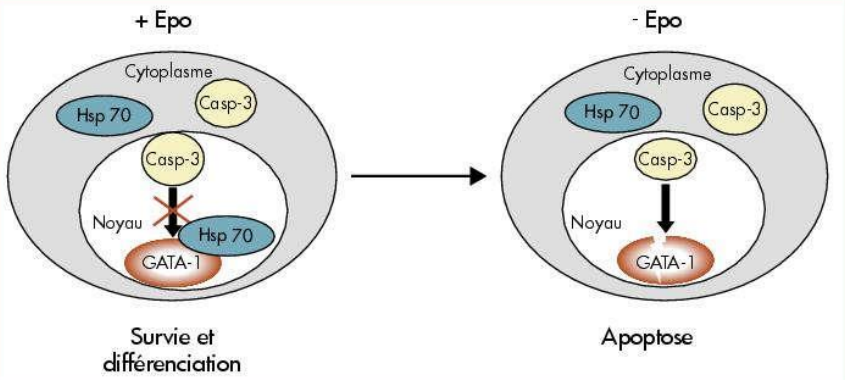


Figure 10 : HSP70 protège GATA1 du clivage par les caspases dans les érythroblastes

En présence d'EPO, HSP70 est localisé dans le noyau et protège GATA1 du clivage par les caspases, ce qui permet la survie et la différenciation des érythroblastes.
En absence d'EPO, HSP70 est localisé sans le cytoplasme ce qui rend GATA1 accessible aux caspases. Son clivage induit l'apoptose des érythroblastes (Vandekerckhove et al., 2008).

4. L'érythropoïèse de stress

En plus de l'érythropoïèse basale décrite précédemment, il existe un autre type d'érythropoïèse qui se produit en réponse à un stress anémique comme l'hypoxie tissulaire. Cette réponse est nommée « l'érythropoïèse de stress », elle implique une production rapide et suffisante de nouveaux érythrocytes afin de compenser les pertes et augmenter la distribution de l'oxygène aux tissus.
L'érythropoïèse de stress est mieux étudiée chez la souris du fait de la disponibilité d'un modèle permettant d'induire une anémie et d'analyser la compensation qui se met en place.

Chez la souris, l'érythropoïèse de stress est extra-médullaire, elle a lieu dans la rate essentiellement (induisant une splénomégalie) et dans une moindre mesure dans le foie adulte, elle réside dans le foie fœtal au cours du développement.
L'érythropoïèse de stress utilise des progéniteurs et des signaux qui diffèrent de ceux utilisés pour l'érythropoïèse basale. En effet, alors que l'érythropoïèse basale nécessite principalement l'EPO et le SCF, l'érythropoïèse de stress nécessite un taux élevé d'EPO en réponse à l'hypoxie, de SCF, BMP4 (bone morphogenetic protein 4) et SHH (Sonic Hedgehog) (Xiang et al., 2015).

En condition d'hypoxie, BMP4, en synergie avec le SCF, induit l'expansion des progéniteurs érythroïdes de stress qui résident dans la rate, appelés BFU-E de stress. Ces derniers deviennent sensibles à l'EPO et se différencient pour produire rapidement un grand nombre d'érythrocytes matures (Perry et al., 2007). De plus, les progéniteurs érythroïdes médullaires qui ne sont normalement pas sensibles au signal BMP4, migrent vers la rate ou le signal SHH stimule leur développement en progéniteurs de stress (Perry et al., 2009).
Les progéniteurs érythroïdes de stress sont caractérisés par l'expression à la fois de marqueurs membranaires de cellules immatures, comme Kit et Sca1, et de marqueurs de cellules matures, comme le Ter119. Les signaux BMP4, SCF et hypoxie induisent l'expansion d'une population caractérisée par l'expression de $Kit^{+}CD71^{+}Ter119^{+}$ (Perry et al., 2007). L'analyse de cette population a pu démontrer que ces cellules peuvent être subdivisées en trois populations de progéniteurs érythroïdes de stress distincts :

- une population I de phénotype $Kit^{+}CD71^{lo/med}Ter119^{lo/-}$ qui contient tous les BFU-E de stress. De façon surprenante, cette population contient également des CSH Kit^{+} et $Sca1^{+}$ ayant un potentiel d'auto-renouvellement.
- une population II exprimant $Kit^{+}CD71^{hi}Ter119^{med}$ et qui génère des CFU-E,
- et une dernière population III qui exprime $Kit^{+}CD71^{lo/med}Ter119^{hi}$ et qui n'a pas de capacité à former des colonies.Elle est constituée de 50% de cellules hémoglobinisées (Harandi et al., 2010).

D'autre part, après induction d'une érythropoïèse de stress par la phénylhydrazine chez la souris, une augmentation d'une population de progéniteurs $CD34^{+}Kit^{+}Sca1^{+}Lin^{-}$ dans la rate a été observée. Ces cellules ont été identifiées comme étant la population de progéniteurs érythroïdes médullaire qui migrent vers la rate pour devenir des progéniteurs de stress (BFU-E de stress) (Harandi et al., 2010).

Contrairement à la souris, l'érythropoïèse de stress chez l'homme a lieu uniquement dans la moelle osseuse. Son étude est compliquée puisqu'il n'existe pas de modèle permettant d'analyser les mécanismes impliqués dans sa régulation. Des études ont permis de démontrer que l'érythropoïèse de stress humaine a des propriétés similaires à l'érythropoïèse fœtale, comme l'expression de l'hémoglobine fœtale (HbF) (Stamatoyannopoulos et al., 1985). De plus, l'analyse des cellules de sang périphérique et de progéniteurs de moelle de patients drépanocytaires a permis d'identifier une population de progéniteurs érythroïdes exprimant à la fois des marqueurs de cellules immatures et des marqueurs de cellules matures comme le CD34, la GPA, le CD71 et le c-KIT. Ces progéniteurs donnent naissance à une population de cellules exprimant l'HbF. Cette population de cellules CD34+GPA+CD71+c-KIT+ pourrait être l'équivalent de la population de progéniteurs médullaires CD34+Kit+Sca1+Lin- observée chez la souris (Luck et al., 2004).

Le développement d'un modèle de culture *in vitro* de progéniteurs érythroïdes de stress a permis de mieux étudier l'érythropoïèse de stress humaine et de confirmer que la moelle osseuse humaine contient des progéniteurs qui peuvent générer des BFU-E de stress similaires à ceux observés dans l'érythropoïèse de stress murine (Xiang et al., 2015) .

5. Métabolisme énergétique de l'érythropoïèse

Toutes les cellules vivantes ont besoin d'énergie pour survivre, proliférer et se différencier. Dans la plupart des cellules de mammifères, l'énergie est fournie par la dégradation de trois principaux nutriments : le glucose, la glutamine et les acides gras. Bien que les nutriments soient essentiels pour toutes les cellules, les exigences métaboliques peuvent être extrêmement divergentes selon le type cellulaire et l'état prolifératif des cellules. En effet, les cellules quiescentes, en prolifération ou en différenciation présentent souvent des différences dans leur métabolisme.

Les érythroblastes utilisent le glucose comme principale source d'énergie. Son passage à travers la membrane plasmique est médié par des molécules transporteuses spécialisées, les GLUT (glucose transporters). Les érythrocytes humains expriment plus de GLUT1 que toute autre cellule du corps, avec plus de 300.000 copies par cellule (Mueckler, 1994) . L'expression de GLUT1 dans les érythrocytes est limitée à quelques espèces de mammifères incapables de synthétiser l'acide ascorbique à partir du glucose comme l'homme, les primates supérieurs ou les cochons. En effet, chez la souris par exemple, l'expression de GLUT1 est

perdue pendant la période néonatale et remplacée par l'expression de GLUT4 alors que chez l'homme, l'expression de GLUT1 est maintenue après la période néonatale et permet le transport du glucose et de l'acide dehydroascorbique (DHA) (Montel-Hagen et al., 2008a) (Montel-Hagen et al., 2008b). GLUT3 est également exprimé dans les érythroblastes immatures au cours de la différenciation humaine à un taux similaire à celui de GLUT1, mais son expression diminue rapidement alors que celle de GLUT1 augmente dans les derniers stades de différenciation érythroïde (Gautier et al., 2016a).

Hormis le glucose, d'autres nutriments sont nécessaires à la différenciation érythroïde comme la glutamine. Le récepteur à la glutamine ASCT2 est fortement exprimé dans les CSH et son expression est maintenue durant l'érythropoïèse. Le blocage de l'entrée de la glutamine médiée par l'ASCT2 dans les progéniteurs érythroïdes, ou l'inhibition de la glutaminolyse, inhibe l'engagement des CSH vers le lignage érythroïde et l'oriente vers le lignage myélomonocytaire. Ainsi, le glucose et la glutamine sont cruciaux pour la biosynthèse des nucléotides nécessaires à la prolifération et la différenciation érythroïde (Oburoglu et al., 2014). De plus, la glutamine ainsi que d'autres acides aminés comme la leucine ou l'arginine activent la voie mTORC1 (mammalian target of rapamycin) nécessaire à la régulation de multiples processus comme la synthèse de l'hémoglobine (Jewell et al., 2013). En effet, il a été démontré que l'inhibition du récepteur de la leucine LAT-3 (L-type amino acid transporter 3) chez le zebrafish ou la souris induit l'inhibition du complexe mTORC1, conduisant à un défaut au niveau de l'érythropoïèse via la réduction de la synthèse de l'hémoglobine (Chung et al., 2015). Cependant, le rôle de mTORC1 au cours de l'érythropoïèse reste complexe puisqu'il a également été démontré que l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine pourrait stimuler la différenciation érythroïde murine (Zhang et al., 2014) (Figure 11).

L'érythropoïèse a pour but de produire une quantité suffisante de GR qui vont assurer le transport de l'oxygène aux tissus de l'organisme. En raison de leur teneur en Hb auto-oxydante et de leur fonction de transporteur d'oxygène et de dioxyde de carbone, les érythrocytes sont fortement exposés au stress oxydatif. De plus, l'absence de noyau et des autres organelles ne leur permet pas de synthétiser les protéines nécessaires à leur maintien. La survie des érythrocytes jusqu'à 120 jours dans la circulation sanguine dépend donc fortement de la mise en place d'un système enzymatique permettant de fournir l'énergie nécessaire au maintien de l'intégrité des GR, lutter contre les agents oxydants, réparer les protéines et les lipides endommagés.

L'énergie des GR provient principalement de la dégradation du glucose via la voie de glycolyse anaérobie. Cette voie permet de produire 2 molécules d'ATP nécessaires pour le fonctionnement des pompes du globule rouge notamment les pompes à sodium Na : K-ATPase et du NADH, nécessaires pour maintenir la méthémoglobine (forme oxydée de l'hémoglobine) à un faible taux.

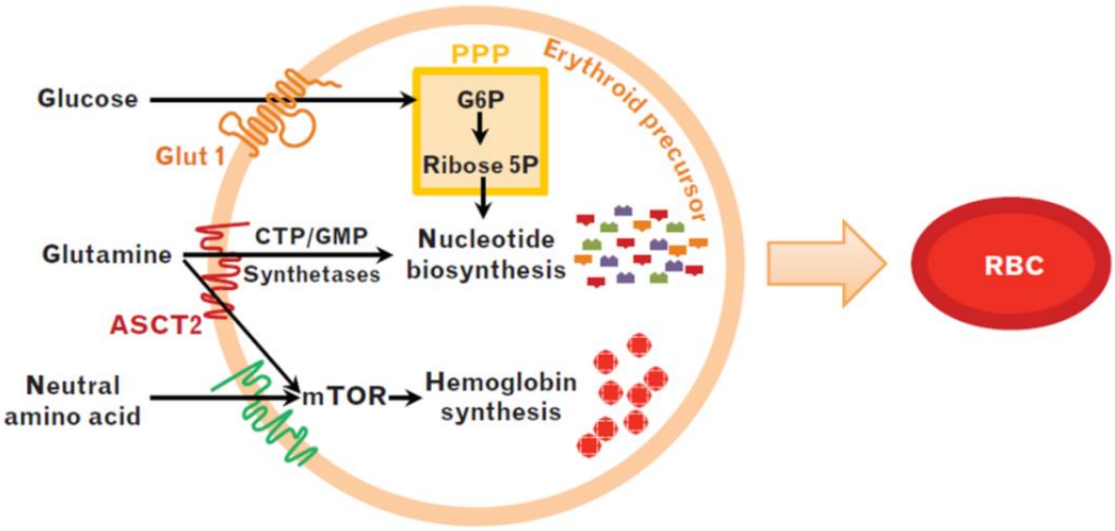


Figure 11 : Le glucose, la glutamine et les acides aminés régulent la différenciation érythroïde via l'induction des voies de biosynthèse (Oburoglu et al., 2016).

B. AMPK (AMP-activated protein kinase)

L'AMPK est une protéine hautement conservée au cours de l'évolution. Elle est présente chez toutes les espèces, les levures (Sucrose non-fermenting 1 ou SNF1), les plantes (SNF1 related kinases) et les mammifères (AMPK).

C'est une enzyme clé dans la régulation du métabolisme énergétique. L'AMPK est activée en réponse à un stress énergétique qui est signalé par une augmentation du ratio AMP/ATP. Cette activation permet en général de réajuster la balance énergétique en stimulant les processus cataboliques impliqués dans la synthèse de l'ATP et en inhibant les voies anaboliques consommatrices de l'ATP.

1. Structure de l'AMPK

L'AMPK est une serine/thréonine kinase, exprimée sous forme de complexe héterotrimérique composé d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices β et γ (Figure 12). Chez les vertébrés, ces sous-unités existent sous de multiples isoformes (α1, α2, β1, β2, γ1, γ2, γ3) codées par des gènes différents (PRKAA1, PRKAA2, PRKAB1, PRKAB2, PRKAG1, PRKAG2, PRKAG3). Ainsi, il est théoriquement possible d'obtenir 12 combinaisons hétérotrimériques αβγ différentes. L'expression de certaines isoformes varie en fonction des tissus comme par exemple l'expression de l'isoforme γ2 qui est majoritaire dans le cœur alors que l'expression de l'isoforme γ3 semble spécifique au muscle squelettique. Cette expression différentielle des isoformes entre les tissus suggère l'existence de propriétés tissus spécifiques (Ross et al., 2016).

La sous-unité catalytique α (62 kDa) comprend un domaine kinase (α-KD) localisé dans la partie N-terminale. Il contient dans sa boucle d'activation une thréonine très conservée (Thr172) dont la phosphorylation est nécessaire à l'activation de l'AMPK (Hawley et al., 1996) (Willows et al., 2017). Le domaine α-KD est suivi d'un domaine d'auto-inhibition (α-AID) qui régule négativement l'activité catalytique basale de l'AMPK (Crute et al., 1998). Le domaine C-terminal permet l'interaction avec les sous-unités β et γ (Xiao et al., 2011).

La sous-unité β contient dans sa partie N-terminale un site de myristoylation et plusieurs sites de phosphorylation. Ces modifications post-traductionnelles peuvent avoir un effet sur la localisation cellulaire de l'AMPK ainsi que sur son activité enzymatique (Warden et al., 2001). Cette région est suivie d'un domaine CBM (carbohydrate-binding module) appelé

aussi domaine GBD (glycogen binding domain). Comme son nom l'indique, ce domaine lie le glycogène et les petits oligosaccharides ce qui module l'activité enzymatique de l'AMPK et lui confère une sensibilité aux variations du taux de sucre (Koay et al., 2007) . La région C-terminal de la sous-unité β permet sa liaison aux autres sous-unités (α et γ) (Xiao et al., 2007).

Les sous-unités γ possèdent une grande variation de taille entre elles. Elles contiennent un domaine de liaison aux nucléotides formé par 4 domaines CBS (cystathionine β synthase) consécutifs qui sont assemblés par paire pour former 2 domaines Batman. Chez les mammifères, CBS1 et CBS3 sont les sites régulateurs, ils peuvent lier une molécule d'AMP, d'ADP ou d'ATP de façon réversible. Le site CBS2 ne semble pas lier de nucléotides (Xiao et al., 2007) alors que le site CBS4 lie de façon permanente une molécule d'AMP. Cependant, il a récemment été décrit que le site CBS4 peut lier aussi une molécule d'ATP avec une affinité moindre (Calabrese et al., 2014). En amont du premier site CBS, il existe une petite séquence de liaison à la sous-unité β (Viana et al., 2007).

Les mutations de l'AMPK sont rares, les seules qui ont été mises en évidence touchent la sous-unité γ.

Chez le porc, la mutation de la sous-unité γ3 entraine une accumulation du glycogène au niveau musculaire ce qui a des conséquences néfastes sur la qualité de la viande (Cheung et al., 2000).

Chez l'homme, la mutation de la sous-unité γ3 entraine également une accumulation du glycogène au niveau musculaire (Costford et al., 2007), alors que la mutation de la sous-unité γ 2 entraine une accumulation du glycogène au niveau cardiaque induisant un trouble de conduction cardiaque (syndrome de Wolff-Parkinson-White) (Scott et al., 2004).

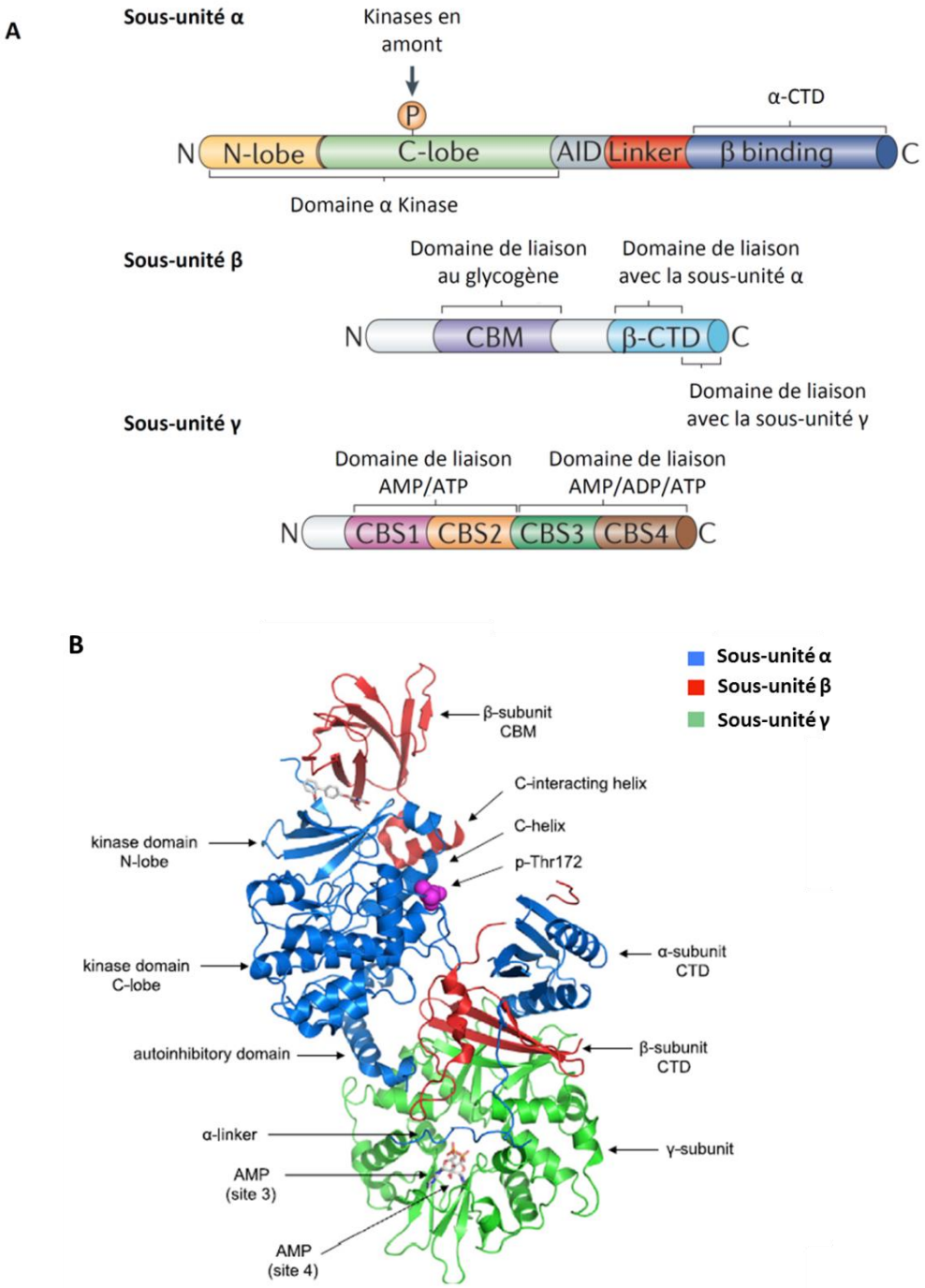


Figure 12 : Structure de la protéine AMPK

(A) L'AMPK est une protéine hétérotrimétique composée d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices, β, et γ. **AID**, Auto-Inhibitory Domain; **CTD**, Carboxyl-Terminal Domain, **NTD**, Amino-Terminal Domain, **CBM**, Carbohydrate-Binding Module, **CBS** Cystathione β-Synthetase, séquences répétées dans la sous-unité γ. (Hardie et al., 2012)
(B) structure cristalline du complexe hétérotrimérique de l'AMPK de mammifère α2β1γ1 (Garcia and Shaw, 2017).

2. Régulation de l'activation de l'AMPK

a) Activation allostérique de l'AMPK

L'activation de l'AMPK dépend de deux facteurs : la liaison des nucléotides à la sous-unité γ et la phosphorylation de la Thr172 présente dans le domaine kinase de la sous-unité α, par des kinases en amont (LKB1, CaMKKβ, TAK1) (Figure 13).

L'AMP se fixe aux deux domaines CBS de la sous-unité γ (CBS1 et CBS 3) permettant ainsi :

- Une activation allostérique du complexe et ainsi une augmentation de l'activité de l'AMPK d'un facteur de 2 à 5 (Carling et al., 1989).

- La levée de l'inhibition de la phosphorylation de la Thr172 exercée par la myristoylation de la sous-unité β (Oakhill et al., 2010).

- Un changement de conformation (Suter et al., 2006) qui protège la Thr172 de la déphosphorylation par les phosphatases (Davies et al., 1995) (Kudo et al., 1996).

En plus de l'AMP, il a été démontré que l'AMPK peut lier des molécules d'ADP (Jin et al., 2007). Cette liaison ne permet pas d'induire une activation allostérique, cependant, elle protège le site kinase de la déphosphorylation (Xiao et al., 2011). A l'inverse, la fixation d'une molécule d'ATP à la sous-unité γ antagonise l'effet protecteur de l'AMP et de l'ADP.

b) Activation de l'AMPK par les kinases en amont

En plus de l'activation allostérique, AMPK est activée par phosphorylation de la Thr172 par les kinases en amont ce qui amplifie considérablement son activité. A ce jour 3 kinases ont été identifiées.

La première kinase est **LKB1** (liver-kinase-B1) (Woods et al., 2003). Elle a été identifiée en 1998 comme un suppresseur de tumeur responsable du syndrome Peutz Jeughers (Hemminki et al., 1998). Ce n'est qu'en 2003 que son rôle de régulateur de l'activité de l'AMPK a été mis en évidence (Hawley et al., 2003). LKB1 est une kinase constitutivement activée. Elle forme un complexe avec la pseudo-kinase STRAD (STE20-related adaptor) et la protéine adaptatrice MO25 (Mouse proteine 25) qui permet sa localisation cytoplasmique et son activation constitutive (Baas et al., 2003) (Boudeau et al., 2003). En plus de l'AMPK, LKB1

phosphoryle et active 12 autres cibles appelés AMPK related kinases (ARK), ce qui permet d'expliquer les divergences de phénotype entre les invalidations de LKB1 et de l'AMPK (Lizcano et al., 2004).
En réponse à un stress énergétique (augmentation du ratio AMP/ATP), LKB1 induit l'activation de l'AMPK par phosphorylation de la Thr172. Cette phosphorylation est l'évènement principal requis pour l'activation de l'AMPK, elle permet d'augmenter l'activité de l'AMPK d'un facteur de 100. La phosphorylation de la Thr172 par LKB1 nécessite la fixation d'une molécule d'AMP sur la sous-unité γ de l'AMPK ce qui permet d'inhiber la déphosphorylation de ce site par les protéines phosphatase.

Le deuxième régulateur majeur de l'activité de l'AMPK est la **CaMKKβ** (calcium Ca2+ calmodulin-dependant kinase kinase, appelée aussi CaMKK2). Cette kinase induit l'activation de l'AMPK par phosphorylation sur la Thr 172 en réponse à une augmentation du taux de calcium Ca^{2+} intracellulaire sans nécessiter de variation de la concentration de l'ATP (Hawley et al., 2005) (Hurley et al., 2005). Cette activation de l'AMPK par la CaMKKβ semble être importante dans certains types cellulaires, tels que les neurones, les cellules endothéliales (Stahmann et al., 2006) ou les lymphocytes T (Momcilovic et al., 2006).

La troisième kinase en amont de l'AMPK est **TAK1** (TGFβ activated kinase 1). Elle a été mise en évidence pour la première fois grâce à un criblage génétique chez la levure (Momcilovic et al., 2006). Les conditions physiologiques dans lesquelles TAK1 module l'activité de l'AMPK sont encore à déterminer.

c) Inhibition de l'activité de l'AMPK (régulation par les phosphatases)

Les protéines phosphatases ont également un rôle essentiel dans la régulation de la phosphorylation de la Thr172 de l'AMPK. Il a été démontré par des tests *in vitro* que les protéines phosphatases 2A (PP2A) et 2C (PP2C) induisent la déphosphorylation de la Thr172 (Davies et al., 1995) . La liaison de l'AMP à la sous-unité γ inhibe la déphosphorylation de la Thr172 par PP2C *in vitro* (Sanders et al., 2007).
Les modifications de l'expression et de l'activité des protéines phosphatases modulent l'activation de l'AMPK. En effet, il a été démontré dans les cellules cardiaques de rongeurs que l'augmentation de l'expression de PP2C diminue l'activité de l'AMPK (Wang and Unger,

2005). De plus, la stimulation de l'activité de PP2A induit une diminution de la phosphorylation de l'AMPK dans les cellules endothéliales (Wu et al., 2007) .
Cependant, à l'heure actuelle, les phosphatases responsables de la déphosphorylation de la Thr172 de l'AMPK dans les différents tissus ne sont pas bien connues (Figure 13).

d) Autres régulations de l'activité de l'AMPK

En plus de la phosphorylation de la Thr172 par LKB1, CaMKKβ ou TAK1, l'activation de l'AMPK peut être modulée par la phosphorylation sur d'autres sites. En effet, la sous-unité α1 peut être phosphorylée sur le résidu Ser173 via la PKA (protéine kinase A) (Djouder et al., 2010). Elle peut également être phosphorylée sur le résidu Ser485 (AMPKα2 Ser491) par la PKA et la PKB (protein kinase B appelée aussi AKT) (Pulinilkunnil et al., 2011) ou sur le résidu Ser487 par la PKC (Heathcote et al., 2016) Le GSK3 (glycogen synthase kinase 3) peut également induire la phosphorylation de la sous-unité α1 sur le résidu Thr479 (Suzuki et al., 2013b). Ces phosphorylations exercent un effet inhibiteur sur l'activité de l'AMPK.

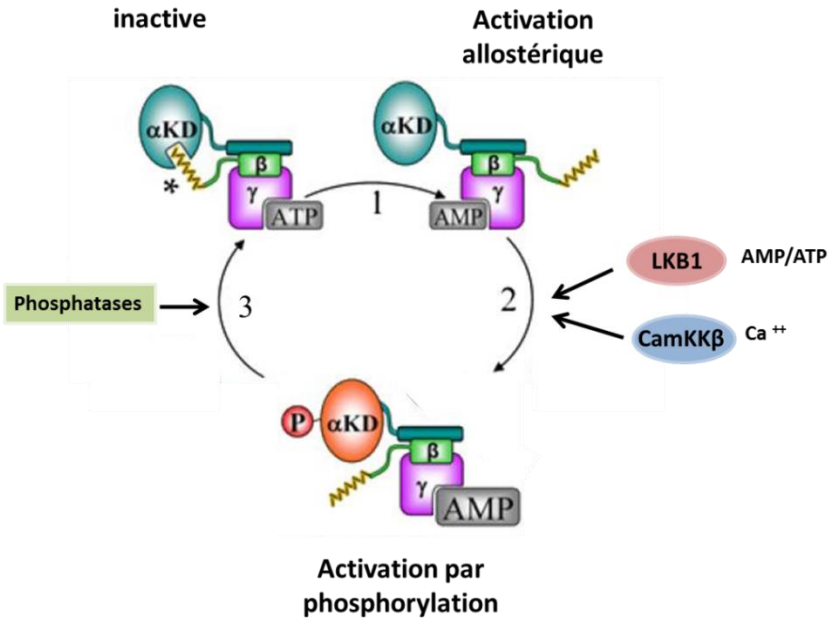


Figure 13 : Régulation de l'activité de l'AMPK.

En présence d'un taux suffisant d'ATP, le groupe myristoyle de la sous-unité β de l'AMPK (jaune*) inhibe la phosphorylation de la Thr172 et maintien le complexe dans un état inactif. En cas de stress énergétique, la fixation de l'AMP permet de lever l'inhibition induite par la myristoylation, et une activation allosterique de l'AMPK. Les kinases en amont induisent la phosphorylation de la Thr172 qui est protégée de la déphosphorylation grâce au changement conformationnel induit par la fixation de l'AMP. La restauration du taux d'ATP reverse l'activation de l'AMPK. (Oakhill et al., 2010).

e) Activation et inhibition pharmacologique de l'AMPK

(1) Les activateurs pharmacologiques de l'AMPK

Les composés chimiques qui activent l'AMPK peuvent être divisés en trois groupes en fonction de leurs mécanismes d'action (Figure 14).

a) Les activateurs indirects de l'AMPK : ils augmentent le taux de l'AMP et l'ADP intracellulaires.

b) Les activateurs mimétiques de l'AMP : ils sont ainsi capables de lier l'AMPK au niveau des domaines CBS de la sous-unité γ de l'AMPK.

c) Les activateurs directs : ils se fixent de façon sélective au niveau de l'interface entre le domaine CBM de la sous-unité β et le domaine α-DK de la sous-unité α.

(a) Les activateurs indirects de l'AMPK

La majorité des drogues qui activent l'AMPK en augmentant le ratio d'AMP/ATP agissent en inhibant les chaines respiratoires mitochondriales et ainsi la production de l'ATP. Les biguanides qui incluent la metformine et son analogue la phenformine, activent l'AMPK en inhibant le complexe I de la chaine respiratoire mitochondriale ce qui conduit à l'augmentation du ratio AMP/ATP. La metformine est l'antidiabétique oral le plus largement prescrit. Une grande proportion de ses propriétés hypoglycémiques sont considérées comme médiées par l'activation de l'AMPK (Duca et al., 2015), bien que des effets indépendants de l'AMPK soient également impliqués dans l'action de la metformine (Madiraju et al., 2014).

Les poisons des mitochondries tels que l'oligomycine ou la rotenone ainsi qu'un grand nombre de composés dérivés des plantes comme le resvératrol, la berbérine ou la galégine ont également été décrits comme induisant l'activation de l'AMPK en inhibant les différents composants de la chaîne respiratoire (Hardie, 2013) (Hawley et al., 2010).

Les inhibiteurs de la glycolyse, tel le 2-désoxyglucose (une forme de glucose non hydrolysable) induisent l'augmentation du taux de l'AMP pour activer l'AMPK dans les cellules qui dépendent de cette voie métabolique pour générer de l'ATP.

Une autre approche qui consiste à augmenter le taux de l'AMP intracellulaire en inhibant l'AMP desaminase (AMPD) a été mise en évidence. L'AMPD convertit l'AMP en IMP (acide inosinique). Ainsi, son inhibition augmente le taux d'AMP ce qui conduit à l'activation de l'AMPK (Plaideau et al., 2014). Des travaux ont suggéré que la metformine peut contrôler les niveaux d'AMP par des effets sur l'AMPD (Ouyang et al., 2011).

(b) Les activateurs mimétiques de l'AMP

La deuxième classe inclut les composés qui activent l'AMPK en mimant l'effet de l'AMP. Ces agents sont administrés dans la cellule sous forme de pro-drogue puis sont métabolisés en analogues de l'AMP. Le membre le plus connu de cette classe est l'AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide 1-β-D-ribofuranoside). Il est incorporé dans la cellule par les transporteurs d'adénosine puis converti en ZMP (analogue non métabolisable de l'AMP). Il se fixe sur le domaine CBS 3 de la sous-unité γ et mime tous les effets de l'AMP sur l'AMPK (Corton et al., 1995) .

Un nouvel analogue de l'AMP a été mis en évidence. Le composé 2 (C2) (5-(5-hydroxyl-isoxazol-3-yl)-furan-2-phosphonic acid) est incorporé dans la cellule sous forme de pro-drogue 13 (C13) (Gómez-Galeno et al., 2010) . Le C2 est plus puissant que l'AMP ou le ZMP, mais contrairement à ces derniers, il active uniquement les complexes contenant la sous-unité AMPKα1. La spécificité de ce composé pour la sous-unité α1 provient de la séquence peptidique reliant le domaine d'auto-inhibiteur au domaine C terminal, puisque l'insertion de cette séquence sur AMPKα2 est suffisante pour que le composé 13 soit actif sur AMPKα2. Bien que le ZMP soit suspecté d'affecter de nombreux processus dépendants de l'AMP indépendamment de l'action de l'AMPK, le C2 a été rapporté comme ayant une spécificité élevée pour l'AMPK (Hunter et al., 2014).

(c) Les activateurs directs

La troisième classe comprend les nouvelles petites molécules qui lient et activent directement l'AMPK. Le premier membre de cette classe qui a été mis au point est la thiénopyridone A-769662 (Cool et al., 2006). Plusieurs composés apparentés ont depuis été mis en évidence, tel que le composé 991 (C991,également connu sous le nom ex229) (Li et al., 2015),

le MT-63-78 (Xiao et al., 2013), le GSK621 (Sujobert et al., 2015), PF-739, PF-249 (Cokorinos et al., 2017) et le MK-8722 (Myers et al., 2017).

De façon similaire à l'AMP, le A-769662 induit une activation allostérique de l'AMPK et protège la Thr172 de la déphosphorylation (Göransson et al., 2007). Cependant, le A-769662 semble utiliser un mécanisme moléculaire diffèrent pour induire cette activation.

L'A-769662 est un activateur β1 sélectif, il active l'AMPK uniquement dans les cellules exprimant la sous-unité β1. De plus, l'activation complète de l'AMPK par ce composé requiert la phosphorylation de l'AMPKβ1 sur la sérine108 (Sanders et al., 2007). Cette phosphorylation semble se faire par autophosphorylation, bien que l'implication de kinases en amont ne peut être exclue (Dite et al., 2017) (Scott et al., 2014).

Il a été décrit que le composé 991 auraient une efficacité plus élevée que le A-769662 d'un facteur de 5 à 10 pour induire l'activation allostérique de l'AMPK et protéger la Thr172 de la déphosphorylation (Xiao et al., 2013). De façon similaire à l'A-769662, le 991 n'active pas les complexes de l'AMPK contenant une mutation de la Ser108 de la sous-unité β, ce qui suggère que ces deux composés partagent un mécanisme moléculaire similaire pour l'activation d'AMPK.

Xiao et al. ont réalisé une étude cristallographique du complexe AMPK humain en présence de A-769662 ou du 991. Il a été démontré que le domaine CBM de la sous-unité β interagit directement avec le KD de la sous-unité α. Cela permet de former une poche ou les activateurs peuvent se fixer par des liaisons hydrophobes. Ce site est distinct des sites de liaison aux nucléotides d'adénine sur la sous-unité AMPKγ. De façon intéressante, l'A-769662 et le 991 présentent une spécificité pour les complexes d'AMPK contenant l'isoforme β1 bien que le 991 soit capable d'activer les complexes contenant β2 avec une affet mindre (Xiao et al., 2013) .

Le salicylate (pro-drogue de l'aspirine) a également été décrit comme activateur direct de l'AMPK (Hawley et al., 2012). Conformément à sa structure similaire à celle de l'A-769662, le salicylate semble se fixer au même site de liaison que les deux composés 991 et A769662. L'activation de l'AMPK par ce composé nécessite également la présence de la sous-unité β 1 et sa phosphorylation sur la sérine 108 (Hawley et al., 2012).

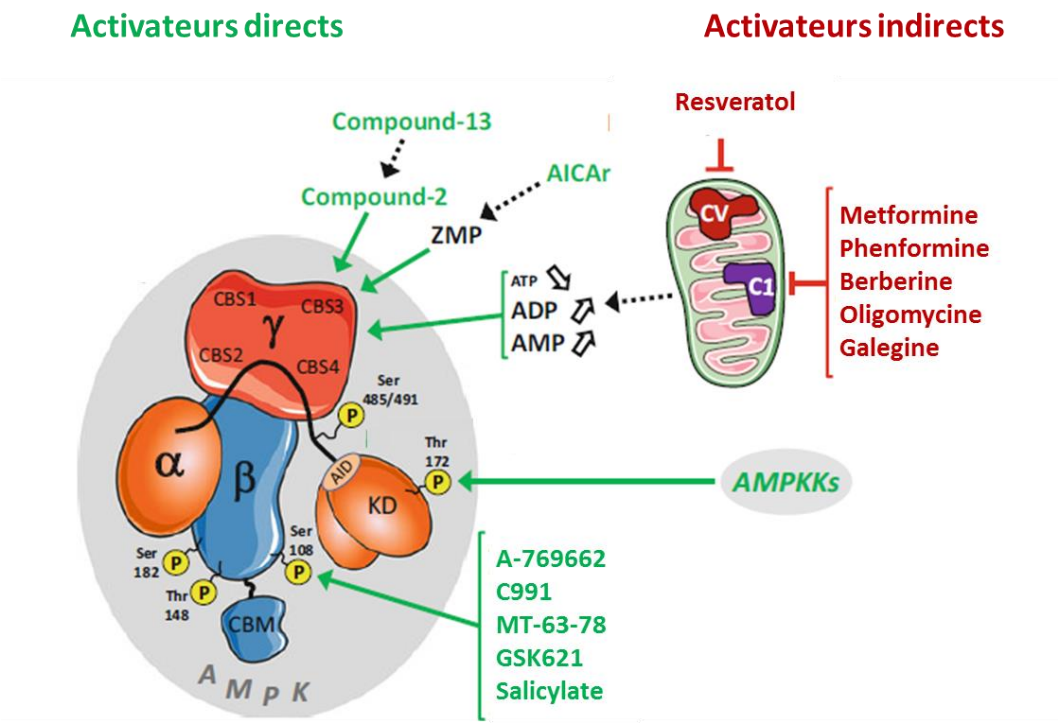


Figure 14 : mécanisme d'action des activateurs de l'AMPK

CBS: Cystathione β-Synthetase, **CBM:** Carbohydrate-Binding Module, **AID:** Auto-Inhibitory Domain, **KD:** kinase domain. Adapté de (Guigas and Viollet, 2016)**.**

(2) Les inhibiteurs pharmacologiques de l'AMPK

Contrairement aux activateurs, il existe peu d'inhibiteurs de l'AMPK.

L'inhibiteur le plus connu est **le composé C**, dérivé du pyrazolo [1,5-a] pyrimidine. Ce composé est un compétiteur de l'ATP.

Son application est limitée car il n'est pas spécifique de l'AMPK, il inhibe également d'autres protéines kinases (Liu et al., 2014). Cependant, malgré ses inconvénients, le composé C reste l'outil pharmacologique principalement utilisé pour étudier le rôle de l'AMPK dans une variété de processus biologiques.

L'iodotubercidine et l'arabinoside d'adénine (vidarabine) sont également des composés qui ont été utilisé pour inhiber l'AMPK. Cependant ils ne sont pas non plus spécifiques de l'AMPK, ils inhibent diverses enzymes et kinases (Henin et al., 1996) (Massillon et al., 1994).

Un autre composé, **le sunitinib** a été d'abord utilisé comme un inhibiteur des tyrosines kinases. L'un de ses effets secondaires est l'induction d'une cardiotoxicité causée par l'inhibition de l'AMPK (Kerkela et al., 2009). Plus tard, un effet inhibiteur direct de l'AMPK a été démontré (Laderoute et al., 2010). Ce médicament a été approuvé pour le traitement de deux types de cancers (le cancer du rein et les tumeurs stromales gastro-intestinales résistantes à l'imatinib). Des essais cliniques pour d'autres types de tumeurs sont en cours (Gan et al., 2009) (Imbulgoda et al., 2014).

3. Conséquences de l'activation d'AMPK

En réponse à un stress énergétique, AMPK est activée afin de rétablir la balance énergétique en inhibant d'une part les voies anaboliques consommatrices d'ATP comme la lipogenèse, la synthèse protéique et la croissance cellulaire et d'autre part, en stimulant les voies cataboliques productrices d'ATP comme la dégradation des acides gras et du glucose et l'induction de l'autophagie.

a) Régulation du métabolisme glucidique et lipidique

Le glucose et les lipides sont des sources majeures d'approvisionnement et de stockage d'énergie dans la cellule. En condition de stress, l'AMPK augmente le taux d'ATP en favorisant leur absorption et leur dégradation et en inhibant leur synthèse et leur stockage.
L'AMPK a également un effet de régulation à long terme sur la transcription des gènes de la lipogenèse.

(1) Régulation du métabolisme glucidique

L'AMPK augmente l'absorption du glucose en favorisant l'expression membranaire des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT4 via la phosphorylation de leurs régulateurs négatifs TXNIP (thioredoxin-interacting protein) (induisant sa dégradation) et TBC1D1 (TBC domain family, member 1) (induisant sa liaison au14-3-3) respectivement (Hardie, 2013) (Wu et al., 2013).
Une fois capté, le glucose est immédiatement oxydé plutôt que d'être stocké sous forme de glycogène. En effet, AMPK induit la glycolyse en phosphorylant PFKFB3 (6-phosphofructo-2-kinase / fructose-2,6-biphosphatase 3) et inhibe le stockage du glucose en inhibant la glycogène synthase (Hardie, 2013).

(2) Régulation du métabolisme lipidique

L'AMPK stimule la captation des acides gras en induisant la translocation à la membrane plasmique du transporteur CD36 (Bonen et al., 2007).

Elle stimule également l'oxydation des acides gras et inhibe leur synthèse en phosphorylant et inactivant l'acétyl-CoA carboxylase (ACC1 et 2) sur la Ser79 (Hardie and Pan, 2002). L'ACC catalyse la première étape de la synthèse des acides gras en induisant la transformation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA. En inactivant l'ACC, l'AMPK induit donc l'inhibition de la synthèse des acides gras. De plus, le malonyl-CoA est un régulateur négatif de l'oxydation des acides gras. Il inhibe leur absorption via l'inhibition du récepteur mitochondrial CPT-1 (carnitine palmitoyl-CoA transferase-1). Ainsi, en empêchant la formation de malonyl-CoA, l'AMPK augmente le taux d'oxydation des acides gras et la production d'ATP (Merrill et al., 1997).

D'autre part, l'AMPK réprime l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras en phosphorylant le facteur de transcription SREBP-1c (Sterol regulatory element-binding protein-1c). La phosphorylation de ce dernier sur la Ser372 inhibe sa translocation nucléaire et ainsi l'accumulation des lipides et la lipogenèse.

b) Régulation de la croissance cellulaire

La croissance des cellules nécessite la disponibilité des nutriments et des réserves énergétiques intracellulaires. En cas de stress énergétique, l'AMPK induit un arrêt de la prolifération cellulaire notamment en inhibant la synthèse des protéines et en induisant un arrêt du cycle cellulaire.

(1) Inhibition de la synthèse protéique

La synthèse protéique représente l'une des voies anaboliques les plus consommatrices d'énergie. L'action majeure de l'AMPK pour maintenir l'homéostasie énergétique en condition de stress métabolique consiste en l'inhibition de deux processus critiques pour la synthèse protéique : l'initiation de la traduction via la régulation de la voie mTORC1 et l'élongation de la traduction via la régulation du facteur eEF2 (Figure 15).

(a) Régulation de l'initiation de la traduction

Le complexe multiprotéique mTORC1 (mammalian Target of Rapamycin complex 1) est composé de mLST8 (mammalian lethal with sec-13 protein 8), Deptor (DEP domain containing mTOR interacting protein), tti1 ((TELO2 interacting protein 1)/tel2 (telomere maintenance 2)), RAPTOR (regulatory associated protein of mTOR) et PRAS 40 (proline-rich Akt substrate 40 kDa).

mTORC1 est un régulateur majeur de l'étape d'initiation de la traduction via ses deux cibles directes p70S6K (p70 ribosomal S6 protein kinase) et 4E-BP1 (eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) – binding protein 1).
La phosphorylation de p70S6K par mTORC1 favorise la traduction en stimulant la synthèse des ARN ribosomaux.
eIF4E est une protéine qui se lie aux ARN messagers et participe à la formation du complexe d'initiation de la traduction. À l'état non phosphorylé, 4E-BP1 inhibe la liaison de eIF4E à l'ARNm. La phosphorylation de la protéine 4E-BP1 par mTORC1 sur plusieurs résidus (T37, T46, S65) libère son partenaire eIF4E et permet la formation du complexe d'initiation de la traduction et ainsi la synthèse protéique (Ma and Blenis, 2009).

AMPK inhibe l'activité de mTORC1 de deux manières :
- Par phosphorylation directe de la sous-unité régulatrice du complexe mTORC1, la protéine RAPTOR sur les sérines 722 et 792. Cela entraine son association à la protéine 14-3-3 et l'inhibition du complexe mTORC1 (Gwinn et al., 2008).
- Par phosphorylation directe de la protéine TSC2 (tuberous sclerosis complex 2) sur le résidu S1345. En effet, l'activation de mTORC1 nécessite son association avec la GTPase, RHEB, liée au GTP. TSC2 a une activité GAP (GTPase activating protein) vis-à-vis de RHEB. Elle induit l'hydrolyse du GTP en GDP permettant ainsi l'inhibition de RHEB et donc du complexe mTORC1 (Inoki et al., 2003) .
Cette inhibition de la voie mTORC1 par l'AMPK induit donc une diminution de la synthèse des ARN ribosomaux et des facteurs de traduction et par conséquent une inhibition de la synthèse protéique (Krause et al., 2002) (Bolster et al., 2002) .

(b) Régulation de l'élongation de la traduction

AMPK régule négativement la synthèse protéique en inhibant le facteur d'élongation de la traduction eEF2 (eucaryotic elongation factor 2). Cette inhibition est médiée par la régulation de la kinase eEF2k (Kinase eucaryotic elongation factor 2).

AMPK phosphoryle et active eEF2k qui va par la suite phosphoryler eEF2 sur un site inhibiteur (Browne et al., 2004).

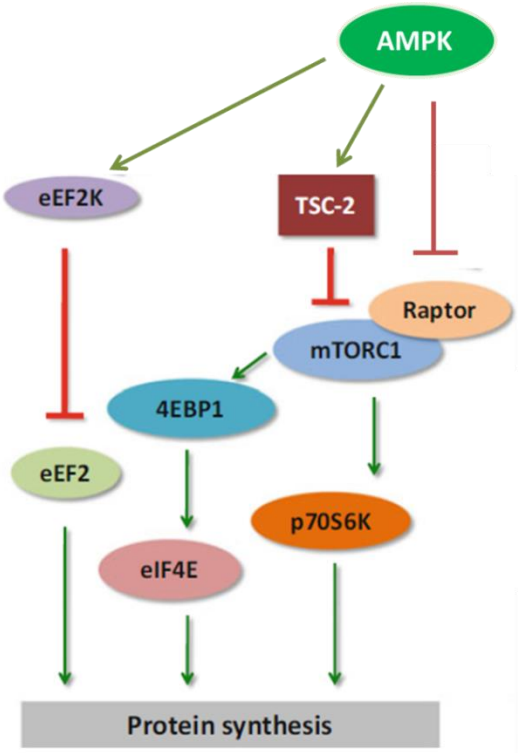


Figure 15 : Implication de l'AMPK dans la régulation de la synthèse protéique

AMPK inhibe la synthèse protéique d'une part en inhibant le complexe mTORC1 par phosphorylation directe sur la sous-unité RAPTOR, ou en activant le régulateur négatif de mTORC1, TSC2. D'autre part en induisant l'inhibition de eEF2. Adapté de (Angin et al., 2016).

(2) Régulation du cycle cellulaire

(a) Mecanismes regulant le cycle cellulaire

La prolifération cellulaire nécessite le déclenchement du cycle cellulaire. Ce dernier est un processus de division complexe qui est régulé par plusieurs protéines qui doivent intervenir de façon transitoire et suivant un ordre chronologique précis.

- **Les complexes cyclines/CDK**

Les CDK sont les principales protéines régulatrices de la progression dans le cycle cellulaire. C'est une famille de serine / thréonine kinases activées à des points spécifiques du cycle cellulaire. Les CDK sont actives uniquement lorsqu'elles sont fixées aux cyclines ce qui permet la formation d'un complexe composé d'une sous-unité catalytique, la CDK, et une sous-unité régulatrice, la cycline. Contrairement au niveau d'expression des CDKs qui reste stable, celui des cyclines varie pendant le cycle cellulaire permettant ainsi la régulation de l'activité des CDKs durant les différentes phases (Evans et al., 1983).

- **La cinétique d'expression et de dégradation des cyclines**

Les signaux mitogènes comme par exemple ceux contrôlés par les gènes Myc et Ras, induisent l'expression des cyclines D (cycline D1, cycline D2, cycline D3) qui se lient et activent préférentiellement CDK4 et CDK6. Ce complexe régule l'entrée et le déroulement de la phase G1. Les cyclines E (cycline E1, cycline E2) prennent le relais et s'associent et activent CDK2 pour contrôler l'entrée en phase S. Au sein de la phase S, il existe un autre point de contrôle régulé par la cycline A associée à CDK1 ou CDK2 permettant la progression dans la phase S. La phase G2 est régulée par le complexe cycline A/CDK1. Enfin, la transition G2/M et l'entrée en mitose sont régulées par la cycline B associée à CDK1 (Malumbres and Barbacid, 2009) (Hochegger et al., 2008) (Figure 16).

- **Régulation négative du complexe cycline /CDK**

L'activité des complexes cycline/CDK peut être inhibée par les CKI (Cyclin-dependent Kinase Inhibitors) incluant $p21^{Waf1/Cip1/Sid1}$ et $p27^{Kip1}$ (Besson et al., 2008).

En effet, $p21^{Waf1/Cip1/Sid1}$ et la $p27^{Kip1}$ contrôlent la transition G1/S en inhibant l'activité des complexes cycline E/CDK2 et cycline A/CDK2.

L'action de $p21^{Waf1/Cip1/Sid1}$ est sous le contrôle de p53. Des perturbations comme les dommages de l'ADN induisent une stabilisation de la protéine p53 via sa phosphorylation sur la Ser15. Cette stabilisation induit l'expression de la protéine p21 et par conséquent un arrêt l'arrêt du cycle cellulaire. $p21^{Waf1/Cip1/Sid1}$ peut réguler également la transition G2/M en inhibant l'activité du complexe cycline B/CDK1 (Figure 16).

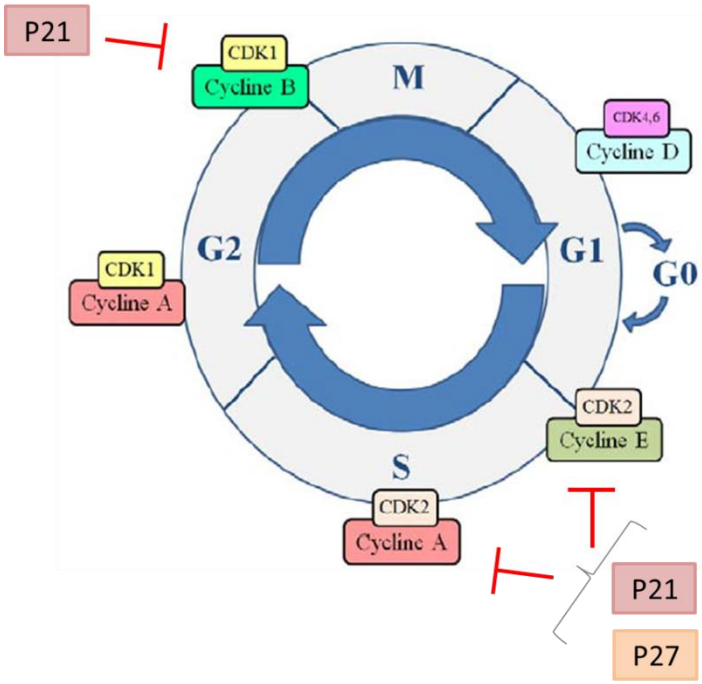


Figure 16 : Répartition des complexes CDK/cycline au cours du cycle cellulaire

(b) Régulation du cycle cellulaire par l'AMPK

Le cycle cellulaire est un processus nécessitant de grandes quantités d'énergie. Afin de rétablir la balance énergétique, l'AMPK utilise différents mécanismes pour induire l'arrêt du cycle cellulaire.

MDMX (MDM4) est un régulateur négatif de p53, il induit son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome. L'AMPK peut phosphoryler MDMX sur la Ser342, favorisant son association avec 14-3-3. Cela induit l'arrêt du cycle cellulaire en favorisant la stabilisation et l'activation de p53 (He et al., 2014).
AMPK peut également phosphoryler directement p53 sur la Ser15 pour la stabiliser et induire l'arrêt du cycle cellulaire à la transition G1/S (Jones et al., 2005).

p53 inhibe mTORC1 en induisant l'expression de gènes régulant négativement sa fonction, comme IGFBP3 (insulin-like growth factor-binding protein 3), PTEN (phosphatase and tensin homolog) et TSC2 (Buckbinder et al., 1995) (Feng et al., 2007). Ainsi, la stabilisation de p53 par l'AMPK induit non seulement l'arrêt du cycle cellulaire mais favorise également de façon indirecte l'inhibition de la synthèse des protéines.

Par ailleurs, l'AMPK peut être activée en aval de p53. En effet, il a été démontré que les Sestrin1 et Sestrin2, deux gènes cibles de p53, pouvaient activer l'AMPK (Budanov and Karin, 2008).

Il a été démontré que l'AMPK pouvait aussi phosphoryler directement la protéine $p27^{KIP}$ sur le résidus Thr 198, induisant sa stabilisation et ainsi l'arrêt du cycle cellulaire en G1 (Liang et al., 2007a) .

Bien que le rôle majeur de l'AMPK soit la régulation du métabolisme énergétique, son implication dans la régulation du cycle cellulaire indépendamment de sa fonction de régulateur métabolique a également été mise en évidence.

L'implication de l'AMPK dans la régulation de la progression en mitose a été suggérée. Cette régulation serait médiée par la phosphorylation directe de la protéine phosphatase PP1R12C (Protein Phosphatase 1 regulatory subunit 12C), permettant sa liaison à la protéine 14-3-3 et l'induction de la phosphorylation des chaines légères de myosines. (Banko et al., 2011).

Une autre étude a démontré un rôle de l'AMPK dans la stimulation de progression en phase S via la régulation de la transcription de la cycline A2 médiée par CREB/ATF (Merlen et al., 2014a).

c) Induction de l'Autophagie

(1) Les mécanismes régulant l'autophagie

L'autophagie est l'un des principaux processus cataboliques essentiels à l'homéostasie cellulaire. Il consiste à intégrer au sein de vésicules à doubles membranes (les autophagosomes) des organites ou macromolécules dysfonctionnelles pour les dégrader via les enzymes lysosomales et recycler leurs composants primaires essentiels à la survie cellulaire.

En condition de stress, une sur-activation de l'autophagie permet aux cellules de s'adapter et survivre. Cependant, une activation excessive et dérégulée de l'autophagie peut conduire à la mort cellulaire (Mizushima, 2007) .
L'autophagie peut être un processus non sélectif ou sélectif car les protéines autophagiques et les récepteurs de l'autophagosome peuvent interagir spécifiquement avec le composant cytoplasmique à éliminer, comme les mitochondries (mitophagie), les peroxisomes (pexophagie) ou encore les lipides (lipophagie).

La formation de l'autophagosome se déroule en trois étapes : l'initiation, la nucléation et l'élongation (Figure 17).

- **L'initiation**

Chez les mammifères, l'initiation de l'autophagie nécessite la formation du complexe ULK, composé de la sérine-thréonine kinase ULK 1 ou ULK 2, ainsi que des protéines ATG13, ATG101 (ATG signifiant autophagy-related protein) et FIP200. Le complexe ULK est recruté au niveau du réticulum endoplasmique et initie la formation du phagophore via le processus de nucléation (Chan et al., 2009) .

- **La nucléation**

La nucléation fait intervenir un complexe VPS34 composé de la kinase VPS34 (vacuolar protein sorting 34), Beclin-1 et VPS15. Ce complexe interagit avec d'autres partenaires afin de moduler son activité. Le recrutement d'ATG14L permet de réguler les premières étapes de la formation de l'autophagosome et l'association à l'UVRAG (ultraviolet irradiation resistance associated gene) permet de réguler sa maturation (Matsunaga et al., 2009).

- **L'élongation - maturation**

Deux systèmes de conjugaison ATG5-ATG12 et LC3 sont nécessaires à l'élongation et à la fermeture de l'autophagosome.
L'enzyme ATG7 permet l'activation de la protéine ATG12 (Tanida et al., 1999). Cette dernière est transférée ensuite à l'enzyme ATG10 qui va permettre sa conjugaison avec la protéine ATG5 (Shintani et al., 1999). Le système ATG12-ATG5 s'associe à la protéine ATG16L et forme le complexe ATG12-ATG5-ATG16L.
Pour pouvoir exercer son rôle dans l'élongation, LC3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) doit subir plusieurs modifications. Elle est d'abord clivée par l'action de la

protéase ATG4 pour former LC3-I. L'enzyme ATG3 va permettre la lipidation de LC3-I en le conjuguant au phosphatidyléthanolamine et former ainsi LC3-II (Ichimura et al., 2000).

Les autophagosomes formés fusionnent avec les lysosomes pour former un autolysosome dont le contenu est dégradé par les hydrolases lysosomales conduisant au recyclage des nutriments.

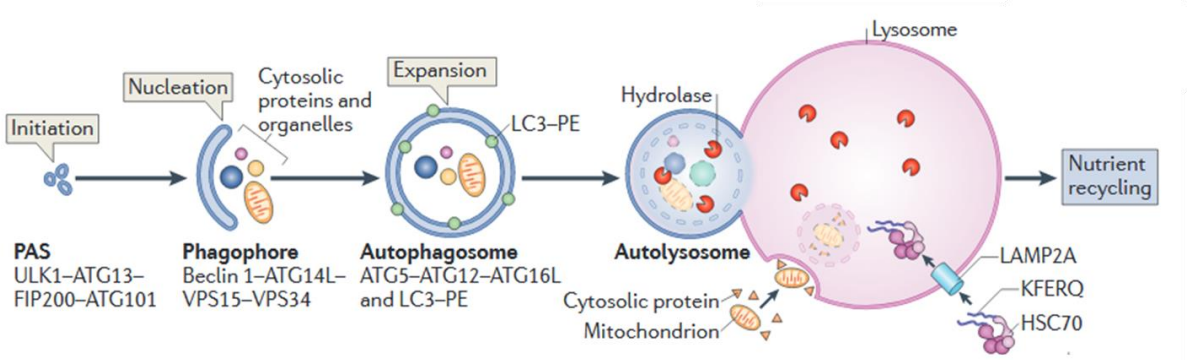


Figure 17 : Les étapes de formation de l'autophagosome

L'initiation commence par la formation du site d'assemblage du phagophore (PAS). Cette étape est médiée par le complexe ULK constitué de ULK1, ATG13, ATG101 et FIP200. La nucléation consiste en la formation du phagophore. Elle fait intervenir pour cela le complexe VPS34, composé de la protéine VPS34, Beclin-1, VPS15 et ATG14L. L'expansion et la maturation de l'autophagosome sont régulées par le complexe ATG7-ATG12 et ATG16L ainsi que par LC3-E. L'autophagosomes formé fusionne avec le lysosome pour former un autolysosome dont le contenu est dégradé par les hydrolases lysosomales conduisant au recyclage des nutriments (Kaur and Debnath, 2015).

(2) Régulation de l'autophagie par l'AMPK

(a) Régulation de l'autophagie non sélective

L'activation de l'AMPK peut induire l'autophagie par plusieurs mécanismes (Figure 18).

L'AMPK phosphoryle directement ULK1 sur le résidu Ser555, cela permet l'activation de cette kinase nécessaire à la formation du complexe d'initiation de l'autophagie (Kim et al., 2011a).

D'autre part, l'AMPK active l'autophagie en inhibant mTORC1. En effet, mTORC1 a été identifié chez la levure (Noda and Ohsumi, 1998) puis chez les mammifères (Ravikumar et al., 2004) comme étant un inhibiteur de l'autophagie. Son mécanisme d'action implique la

phosphorylation directe de ULK1 sur le résidu Ser757, ce qui inhibe son activité kinase et ainsi l'induction de l'autophagie (Jung et al., 2009). mTORC1 peut également inhiber l'autophagie en phosphorylant et activant la protéine inhibitrice de l'autophagie DAP1 (Death Associated protein 1) (Koren et al., 2010).

AMPK stimule aussi l'autophagie de façon indépendante de ULK1 et cela via la régulation des différents complexes contenant VPS34. En effet, l'AMPK phosphoryle et inhibe VPS34 dans les complexes contenant des régulateurs négatifs de l'autophagie comme Rubicon ou Bcl-2. Cependant AMPK active le complexe VPS34 pro-autophagique en phosphorylant Beclin1 sur la Ser91 et la Ser94 permettant ainsi l'induction de l'autophagie (Kim et al., 2013).

Enfin, bien que la protéine $p27^{kip1}$ est principalement connu pour son implication dans la régulation du cycle cellulaire. Il a été décrit que la phosphorylation de $p27^{kip1}$ sur la Thr 198 par AMPK permet sa stabilisation et l'induction de l'autophagie (Liang et al., 2007a).

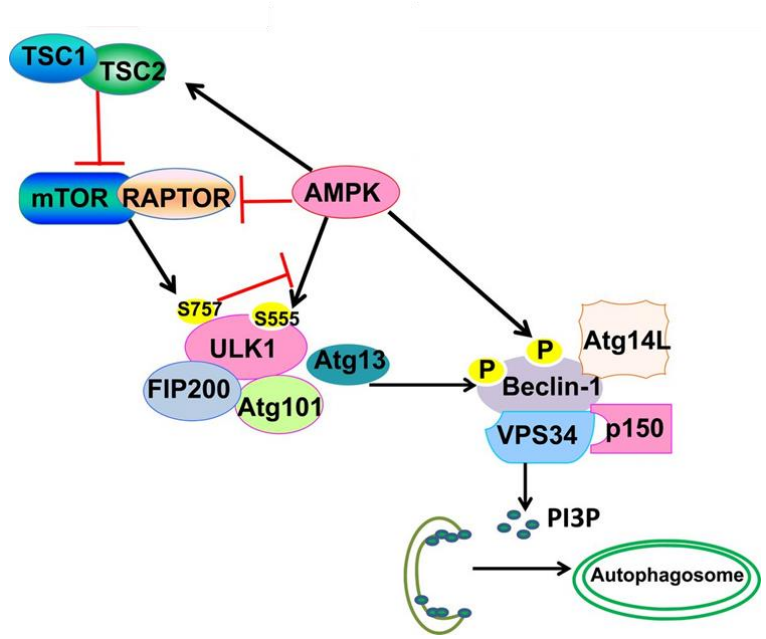


Figure 18 : régulation de l'autophagie par l'AMPK

mTORC1 régule négativement l'autophagie en phosphorylant et inactivant ULK1 sur la Ser757. L'AMPK régule l'autophagie à trois niveaux : en inhibant mTORC1 par phosphorylation de TSC2 ou RAPTOR; en phosphorylant et activant directement ULK1 (S555); en induisant l'activité de VPS34 en phosphorylant Beclin 1.

(b) Régulation de l'autophagie sélective (mitophagie)

Les mitochondries sont les principaux fournisseurs d'énergie dans les cellules. Différents stress peuvent affecter l'intégrité et le fonctionnement mitochondrial conduisant à une production excessive des ROS (espèces réactives d'oxygène) et une altération de la production d'ATP et par conséquence à un déficit énergétique. Ainsi, les mitochondries endommagées doivent être réparées ou éliminées. Le processus d'élimination des mitochondries par autophagie est appelé mitophagie. Il permet de séquestrer les mitochondries non fonctionnelles dans des autophagosomes puis de les transporter dans les lysosomes pour être dégradées.

Une étape importante qui précède la mitophagie est la fragmentation des mitochondries endommagées. Les fragments plus petits qui en résultent sont probablement plus efficacement éliminés par les autophagosomes. Ce processus est appelé la fission mitochondriale.

Il a été décrit que l'AMPK pouvait induire la fission mitochondriale et la mitophagie. Chez les mammifères, l'absence de l'AMPK a pour conséquence une accumulation aberrante de mitochondries déficientes.

Bien que le rôle de ULK1 dans l'initiation de l'autophagie soit bien connu, il a récemment été suggéré un rôle de ULK1 dans la mitophagie (Mizushima, 2007) (Kundu et al., 2008). Une étude récente a démontré qu'en réponse à l'hypoxie, ULK1 est transloqué dans les mitochondries déficientes et phosphoryle FUNDC1 (FUN14 Domain Containing), un récepteur exprimé à la membrane mitochondriale externe. La phosphorylation de FUNDC1 permet son interaction avec LC3 et l'induction de la dégradation des mitochondries par autophagie (Liu et al., 2012) .

Il a également été démontré que la phosphorylation de ULK1 sur la Ser555 par AMPK était cruciale pour sa translocation à la mitochondrie. De plus cette phosphorylation est aussi importante pour l'initiation de la mitophagie (Tian et al., 2015).

AMPK induit la fission mitochondriale en réponse à un stress énergétique via la phosphorylation directe de MFF (mitochondrial fission factor) sur les résidus Ser155 et Ser172, ce qui permet le recrutement de DRP1 (dynamine- Protéine 1 apparentée), l'enzyme qui catalyse la fission mitochondriale. Une fois aux mitochondries, DRP1 divise les mitochondries endommagées en fragments plus petits pour faciliter leur élimination par les autophagosomes (Toyama et al., 2016) (Figure 19).

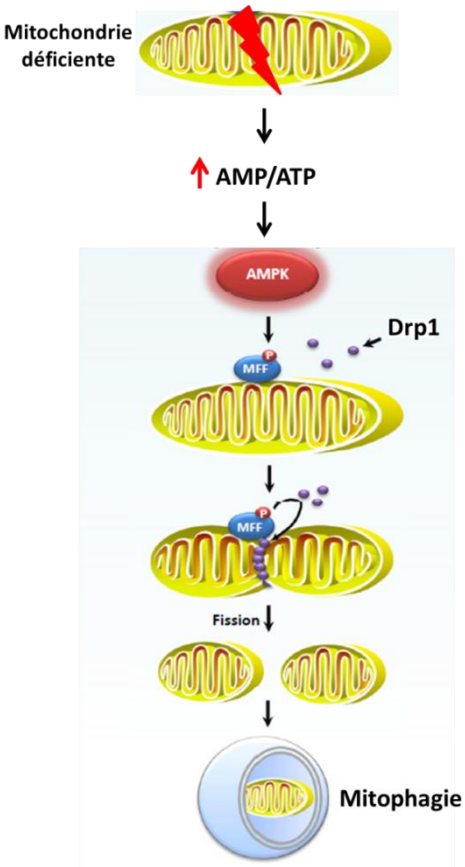


Figure 19 : Régulation de la mitophagie par l'AMPK

Différents stress peuvent altérer les mitochondries conduisant à une production excessive des ROS. Cela conduit à une augmentation du ratio AMP/ATP et une activation de l'AMPK. Cette dernière phosphoryle MEF ((mitochondrial fission factor) sur la Ser155 et Ser172 ce qui permet le recrutement de DRP1 (dynamine- Protéine 1 apparentée) à la mitochondrie. DRP1 va ainsi catalyser la fission mitochondriale afin de faciliter leur élimination.

d) Régulation de la biogenèse mitochondriale par l'AMPK

Le maintien de l'intégrité mitochondriale nécessite d'une part, la dégradation des mitochondries endommagées par autophagie et d'autre part, la production de nouvelles mitochondries par biogenèse. Ainsi, la biogenèse mitochondriale est un processus crucial permettant aux cellules de maintenir leur capacité à générer de l'ATP et de répondre en cas de stress énergétique.

Le principal régulateur de la biogenèse mitochondriale est le PGC-1α, cofacteur induisant la transcription des gènes mitochondriaux. L'AMPK induit l'activation de PGC-1α soit par sa phosphorylation directe (Jäger et al., 2007) ou en induisant sa déacétylation via l'activation de la SIRT 1 (sirtuin1) (Cantó et al., 2009). Il a été démontré que la SIRT1 pouvait induire l'activation de l'AMPK via la désacétylation de LKB1 (Lan et al., 2008) ce qui suggère l'existence d'un rétrocontrôle positive entre l'AMPK et la SIRT1.

4. Rôle de l'AMPK dans le cancer

Le rôle de l'AMPK dans le cancer est très discuté dans la littérature. Plusieurs travaux lui confèrent un rôle de suppresseur de tumeur alors que d'autres suggèrent un rôle d'oncogène.

a) Rôle suppresseur de tumeurs de l'AMPK

Les mutations germinales de LKB1 (Liver Kinase B1) sont responsables du syndrome de Peutz-Jeghers (PJS), qui est caractérisé par la présence d'hamartomes gastro-intestinaux, le développement d'anomalies de la pigmentation et une prédisposition aux cancers. Par la suite, des mutations somatiques de LKB1 ont été identifiées dans environ 30% des cas de cancers du poumon non à petites cellules (Sanchez-Cespedes et al., 2002) et dans 20% des cas de cancers du col utérin (Wingo et al., 2009). La mutation de LKB1 chez la souris induit des phénotypes similaires au syndrome PJS humain avec la formation de polypes dans le tractus gastro-intestinal et une fréquence accrue de cancers du foie, des os et de l'endomètre (Ollila and Mäkelä, 2011). Ces résultats confèrent à LKB1 le rôle de gène suppresseur de tumeurs.

L'activation de l'AMPK étant située en aval de LKB1 suggère un rôle suppresseur de tumeur à l'AMPK. De plus, les conséquences fonctionnelles de cette activation (arrêt du cycle cellulaire, inhibition de la croissance cellulaire et inhibition de l'effet Warburg) sont en faveur d'un rôle de suppresseur de tumeur.

En effet, l'activation de l'AMPK provoque un arrêt du cycle cellulaire associé à la stabilisation de p53, de $p21^{Waf1/Cip1/Sid1}$ et de $p27^{Kip1}$. Il a été démontré que la surexpression d'une forme mutée de l'AMPKα1 (inactive) *in vitro* dans les cellules humaines du cancer de la prostate, induit une accélération la croissance tumorale via la diminution du taux de p53 et de $p21^{Waf1/Cip1/Sid1}$ ainsi que la surexpression de p70S6K et l'IGF1 (Zhou et al., 2009).

L'effet suppresseur de tumeur de l'AMPK est médié également via l'inhibition de mTORC1 qui est le principal régulateur de la survie et de la croissance cellulaire. Ainsi, il a été démontré que l'activation de l'AMPK par la metformine induit la mort des lignées cellulaires humaines du cancer du sein MCF-7 et MDA-MB-231 en diminuant la phosphorylation de la protéine p70S6K via l'inhibition de mTORC1. (Lee et al., 2014).
De plus, l'AMPK peut inhiber l'effet Warburg qui est observé dans la plupart des cancers. Contrairement aux cellules normales, dont le métabolisme énergétique repose principalement

sur le processus de phosphorylation oxydative mitochondriale qui consomme du glucose et de l'oxygène pour produire de l'énergie, les cellules cancéreuses dépendent principalement de la glycolyse pour produire de l'énergie, quelle que soit la disponibilité en oxygène. Ce métabolisme unique est connu sous le nom de " Effet Warburg " (Kim and Dang, 2006).
HIF1α (hypoxia-inducible factor 1) est un facteur de transcription contrôlant l'expression des enzymes et des transporteurs impliqués dans l'effet Warburg. Ainsi, il a été démontré que l'invalidation de l'AMPK chez les souris *in vivo* entraine une accélération du développement de lymphome B induit par c-myc par rapport aux animaux sauvages. Cela a été expliqué par le fait que l'AMPK inhibe le développement des tumeurs en régulant négativement l'effet Warburg via une inhibition post transcriptionnelle du facteur de transcription HIF1α par un mécanisme qui reste à determiner (Faubert et al., 2013).

b) Rôle oncogénique de l'AMPK

Bien qu'il existe des évidences concernant l'effet suppresseur de tumeurs de l'AMPK, des travaux ont démontré que l'AMPK pouvait au contraire promouvoir la survie des cellules cancéreuses en conditions de stress.

Laderoute et al. ont démontré que les MEF (Mouse embryonic fibroblasts) invalidées pour l'AMPK présentent une résistance à la transformation par H-ras, puisque la croissance des tumeurs établies *in vivo* à partir de ces MEF est fortement inhibée (Laderoute et al., 2006).

L'expression des sous-unités α, β et γ de l'AMPK est augmentée dans plusieurs cancers et lignées cellulaires humaines (Li et al., 2012). En effet, en raison des différents stress du microenvironnement tumoral comme l'hypoxie ou les déficiences en nutriments, les cellules cancéreuses peuvent présenter une dépendance accrue à la fonction de l'AMPK afin de promouvoir leur homéostasie métabolique.

L'activation de l'AMPK protège les cellules cancéreuses de la thérapie anticancéreuse en induisant l'autophagie (Park et al., 2009). En effet, il a été observé que l'activité autophagique était significativement élevée dans les cellules cancéreuses résistantes aux traitements. Il a été suggéré que cette autophagie permet de recycler les nutriments nécessaires à la survie cellulaire et permet de maintenir la stabilité génomique des cellules cancéreuses. En effet, l'induction de l'autophagie *in vitro* contribue au maintien de la survie des cellules du cancer

du sein humain (MCF-7) en induisant la réparation de l'ADN via la régulation de la voie ATM (ataxia telangiectasia, mutated) (Yoon et al., 2012).

D'autre part, l'activation de l'AMPK inhibe la biosynthèse des acides gras et augmente leur oxydation pour générer de l'ATP. L'accumulation de NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) généré pendant l'oxydation induit une diminution des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et protège ainsi les cellules cancéreuses contre les dommages causés par le stress oxydatif. Ainsi, il a été démontré *in vitro* dans les cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain (A549) que l'activation de l'AMPK protège les cellules cancéreuses de la mort induite par le stress énergétique (déprivation en glucose) en régulant le taux de NADPH (Jeon et al., 2012).

AMPK a donc un rôle complexe dans le développement et la progression du cancer.
Il a été suggéré que le degré d'activation de l'AMPK pourrait réguler sa fonction dans le cancer. Ainsi, il est possible qu'une activation modérée de l'AMPK par un léger stress puisse exercer des effets protecteurs contre la mort des cellules cancéreuses, alors qu'un excès de stress pourrait induire une forte activation de l'AMPK et entraîner la mort de cellules cancéreuses (Wang et al., 2016b). D'autre part, il a également été suggéré que la fonction de l'AMPK dans le cancer pourrait dépendre du stade de développement de la tumeur. Ainsi, dans les tumeurs précoces, l'AMPK pourrait avoir un rôle de suppresseur de tumeur alors que dans les tumeurs établies AMPK pourrait avoir un rôle d'oncogène (Jeon, 2016).
De ce fait, plusieurs travaux ont proposé d'utiliser des activateurs de l'AMPK pour le traitement du cancer.

c) AMPK cible thérapeutique

Il a été démontré que la metformine pouvait significativement inhiber le développement des cancers et augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses aux drogues anticancereuses, *in vitro* et *in vivo* (Snima et al., 2014). Anisimov et al. ont démontré pour la première fois que la metformine inhibe le développement des adénocarcinomes mammaires *in vivo* chez les souris transgeniques HER-2 /neu (Anisimov et al., 2005).

Des études cliniques ont également révélé une association entre l'utilisation de la metformine et la diminution de l'incidence du cancer. En effet, dans une étude rétrospective de Libby et al.

le développement de cancers a été diagnostiqué chez 7,3% des 4085 patients traités par la metformine contre 11,6% des 4085 témoins (Libby et al., 2009). Une autre étude a démontré que les patients diabétiques traités par la metformine avaient un risque significativement plus faible de développer un cancer du pancréas comparés aux patients non traités par la metformine (Li et al., 2009).

Du fait que la metformine soit un activateur indirect de l'AMPK, il a été démontré que les effets anticancéreux observés peuvent être indépendants de l'AMPK. Récemment, des activateurs directs de l'AMPK ont été développés, leur utilisation dans des études précliniques a démontré des effets anticancéreux encourageants.

En effet, l'activation de l'AMPK par l'activateur direct MT 63-78 *in vitro* dans les lignées cellulaires humaine du cancer de la prostate induit un arrêt du cycle cellulaire en mitose dû à l'inhibition de la lipogenèse nécessaire à la prolifération cellulaire. Ce résultat a été confirmé *in vivo* ou il a été observé que l'activation de l'AMPK par le MT 63-78 induit une réduction du cancer de la prostate alors que son inhibition favorise son développement (Zadra et al., 2014).

L'utilisation des activateurs directs de l'AMPK a également été suggérée pour le traitement des hémopathies malignes. Une étude réalisée au laboratoire a démontré l'intérêt de l'utilisation de l'activateur direct de l'AMPK, le GSK621, *in vitro* pour le traitement des leucémies aigues myéloïdes (LAM). Les cellules humaines de LAM ont une activation constitutive de la signalisation mTORC1, l'activation de l'AMPK associée a celle de mTORC1 induit une apoptose des lignées et cellules primaire de LAM (Sujobert et al., 2015).

5. Rôle de l'AMPK dans la différenciation cellulaire

L'AMPK a un rôle important dans la régulation de multiples processus cellulaires dépendants de son activité de régulateur du métabolisme énergétique comme la survie, la prolifération, ou l'autophagie. Des fonctions non métaboliques de l'AMPK ont été décrites, comme son rôle dans la régulation de la polarité cellulaire ou dans la progression en mitose. Un rôle de l'AMPK dans la régulation de différenciation cellulaire a été démontré, selon le type cellulaire, AMPK peut stimuler ou inhiber la différenciation.

a) Régulation de la différenciation de divers types cellulaires

Ainsi, il a été démontré que l'activation de l'AMPK *in vitro* dans les cellules endothéliales primaires humaines stimule leur différenciation via l'activation de l'enzyme eNOS (endothelial nitric oxide synthase) (Li et al., 2008).

Récemment, Xiaofei et al. ont mis en évidence le rôle de l'AMPK dans la stimulation de la différenciation des cellules épithéliales humaines (Caco-2) via l'induction de l'expression du facteur de transcription CDX2 par une régulation épigénétique (Sun et al., 2017).

Des résultats controversés concernant l'implication de l'AMPK dans la différenciation musculaire ont été décrits. Parmi eux, l'étude de Gamberi et al qui montre que l'AMPK favorise *in vitro* la différenciation des myoblastes murins (C2C12) via l'induction de l'autophagie (Gamberi et al., 2016). Alors que l'étude de Williamson et al. a démontré dans les mêmes cellules, que l'AMPK inhibe leur différenciation via l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S (Williamson et al., 2009).

Un rôle de l'AMPK dans la régulation du devenir des cellules souches mésenchymateuses primaires humaines (CSM) a été mis en évidence. Les CSM ont la capacité de se différencier en chondrocytes, ostéoblastes ou adipocytes. Il a été démontré que l'AMPK induit la différenciation des ostéoblastes en favorisant l'activation des facteurs de transcription osteogenique comme RUNX2 (runt-related transcription factor 2) par la voie ERK/MAPK. Dans le même sens, dans les conditions favorables à la différenciation ostéogénique, l'inhibition de l'AMPK oriente la différenciation des CSM en adipocytes (Kim et al., 2012).

Il a été démontré que l'AMPK régule négativement la différenciation chondrogénique. Ainsi, au cours de la différenciation des cellules murines ATDC-5 en chondrocytes, la phosphorylation de l'AMPK est diminuée. L'induction de son activation conduit à une inhibition de l'expression des gènes spécifiques de la différenciation chondrogenique comme sox6 (Sry-related HMG box), sox9 et col2a1 (collagen, type II, alpha 1) et ainsi la formation des chondrocytes (Bandow et al., 2015).

b) Régulation de la différenciation des cellules hématopoïétiques

En plus du rôle de l'AMPK dans la différenciation de ces divers types cellulaires, son rôle dans la régulation de la différenciation de certaines cellules hématopoïétiques a également été mis en évidence.

(1) AMPK et cellules souches hématopoïétiques

Les CSH résident dans la moelle osseuse et sont maintenues à l'état quiescent chez l'adulte. Cependant, en cas de besoin, elles sont capables de passer à un état prolifératif afin de renouveler le stock de cellules matures ou induire une augmentation rapide d'un ou plusieurs types cellulaires en cas de situation de stress hématopoïétique.

Plusieurs études ont démontré l'importance de la régulation du métabolisme énergétique des CSH pour leur maintien. L'implication de la voie LKB1/AMPK dans ce processus a été mise en évidence grâce à l'utilisation de modèles murins invalidés pour *Lkb1* ou *Ampk* dans les cellules hématopoïétiques.

En effet, la délétion de LKB1 *in vivo* (mais pas de l'AMPK) dans les cellules hématopoïétiques murines induit une augmentation de la division des CSH et leur épuisement rapide ce qui conduit au développement d'une pancytopénie (réduction du nombre de globules rouges, de leucocytes et de plaquettes). L'absence de LKB1 affecte également la survie des CSH et leur capacité à reconstituer à long terme le stock de cellules hématopoïétiques des souris irradiées (Nakada et al., 2010a) (Gan et al., 2010a) (Gurumurthy et al., 2010a) .

LKB1 régule aussi le métabolisme énergétique et le fonctionnement mitochondrial dans les CSH via des mécanismes dépendants ou indépendants de l'AMPK. Ainsi la délétion de LKB1 ou de l'AMPK induit une réduction du taux de l'ATP, une augmentation de la masse mitochondriale et une diminution des copies de l'ADN mitochondrial. Cependant la diminution du potentiel membranaire mitochondrial est observée uniquement en absence de LKB1. De même, le déficit de LKB1 mais non de l'AMPK induit des défauts de stabilité des chromosomes qui conduisent à l'obtention de cellules aneuploïdes en culture.

Ainsi ces études démontrent le rôle de LKB1 dans le maintien des CSH par des mécanismes indépendants de l'AMPK. Cependant, la régulation du métabolisme énergétique et du fonctionnement mitochondrial dans les CSH nécessitent l'implication de l'AMPK.

(2) AMPK et différenciation lymphocytaire (lymphocytes T)

Les lymphocytes sont des cellules immunitaires impliqués dans les mécanismes de défense spécifiques. Ils sont issus de précurseurs hématopoïétiques (thymocytes) présents dans le thymus.

Il existe deux types de lymphocytes T (LT), les lymphocytes T $CD4^+$ responsables de l'activation des autres lymphocytes via la production de cytokines. Les lymphocytes T $CD8^+$ (cytotoxiques) qui ont une activité cytolytique leur permettant d'éliminer les corps étrangers ou les cellules infectées.

Dans les conditions de repos, les cellules immunitaires sont très mobiles mais relativement quiescentes en termes de prolifération et synthèse moléculaires. L'activation d'un lymphocyte T naïf nécessite la reconnaissance grâce à son TCR (T cell receptor) de l'antigène exposé à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) via leur complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Cela constitue un premier signal pour l'activation des LT. L'activation complète d'un LT naïf nécessite l'expansion et la différenciation de celui-ci afin de générer un grand nombre de cellules capables de reconnaitre et de tuer le pathogène.

Ainsi, la réponse immunitaire constitue un processus consommateur d'énergie. Les cellules immunitaires modifient leur activité métabolique afin de répondre à ses besoins pour la croissance cellulaire et les fonctions effectrices.

- **AMPK et différenciation des LTCD8**

Après une infection, les LTCD8 activés se différencient en LTCD8 effectrices (LTeff) et en LTCD8 mémoires (LT mem). Des études ont démontré que l'AMPK pouvait stimuler la différenciation des LT naïfs en LTD8mem. En effet, Pearce et al. ont démontré que les LTCD8 déficitaires en TRAF6 (molécule adaptatrice qui agit en aval de la voie TNFR/TLR) expriment une activité réduite de l'AMPK ce qui conduit à un défaut de formation de LTCD8mem. Alors que l'activation de l'AMPK par la metformine favorise l'oxydation des acides gras et ainsi la production des LTCD8mem *in vivo* après infection par *Listeria monocytogenes* (Pearce et al., 2009).

Il a été suggéré que l'impact de l'AMPK sur le devenir des LTmem pourrait être dû à la ségrégation différentielle de l'AMPK durant la division asymétrique des LT.

L'activation des LTCD8 naïfs par les CPA induit leur expansion et leur différenciation. Durant leur division, les CD8 sont différentiellement ségrégés entre les cellules filles. Les cellules $CD8^{high}$ proximales de la cellule CPA se différencient en LTeff alors que les cellules $CD8^{low}$ distales se différencient en LTmem (Chang et al., 2007). Des travaux récents ont démontré que les régulateurs métaboliques comme mTORC1 et c-Myc ségrégent également de façon différentielle durant la division asymétrique des LTC8 ce qui permet l'obtention de deux cellules filles avec un profil métabolique distinct. Ainsi, mTORC1 a une activité élevée dans les cellules $LTCD8^{high}$ ce qui leur confère un phénotype glycolytique alors que les $LTCD8^{low}$ ont une activité modérée de mTORC1 ce qui leur confère un métabolisme oxydatif (Pollizzi et al., 2016) (Verbist et al., 2016).

La ségrégation asymétrique de l'AMPK a été démontrée dans les lymphocytes B. Dans ces cellules, l'AMPK permet de réguler leur durée de vie en régulant l'homéostasie mitochondriale (Adams et al., 2016). Cette étude soutient la possibilité que la ségrégation différentielle de l'AMPK au cours de la division des LT puisse contribuer à leur différenciation. Ainsi, un faible taux d'AMPK favorise le métabolisme glycolytique dans les LTeff. Alors que l'augmentation de l'activité de l'AMPK dans les LTmem pourrait induire la diminution de l'activité de mTORC1 et augmenter la survie des LTmem en stimulant les voies cataboliques et la régulation de l'homéostasie mitochondriale (Figure 20).

- **AMPK et différenciation des LTCD4**

Les LTCD4+ activés peuvent se différencier en cellules auxiliaires (Th : Th1, Th2, Th17) ou en cellules T régulatrices (Tregs). Des travaux récents ont indiqué que les cellules Th et Treg présentent des profils métaboliques distincts avec des cellules Th exprimant un profil métabolique glycolytique et des Treg exprimant un métabolisme basé sur l'oxydation des acides gras (Michalek et al., 2011).

mTORC1 et HIF1 stimulent la glycolyse ce qui favorise la différenciation des LTCD4 en Th17 et inhibe la production des Treg (Dang et al., 2011). En effet, il a été démontré que les souris déficientes en mTORC1spécifiquement dans les LT ne génèrent pas de Th17 (Delgoffe et al., 2009). Cela est en accord avec les travaux qui ont démontré que l'inhibition de

mTORC1 par la rapamycine favorise l'oxydation des acides gras et ainsi la différenciation des LTCD4 en Treg (Battaglia et al., 2005).

Étant donné le rôle inhibiteur de l'AMPK sur les voies de signalisation mTOR et HIF-1α et son rôle de stimulateur du métabolisme oxydatif, il a été suggéré que l'AMPK puisse être un régulateur central dans l'orientation da la différenciation des LTCD4 en Teff ou Treg. En effet, il a été démontré que les Treg expriment une activité élevée de l'AMPK et que les souris traitées par la metformine ont une augmentation de la formation des Treg *in vivo* (Michalek et al., 2011). D'autre part, des travaux de Berod et al. ont démontré que l'inhibition de l'enzyme nécessaire à la synthèse des acides gras, l'ACC, oriente la différenciation des LTCD4 en Treg (Berod et al., 2014). Ces résultats suggèrent un rôle de l'AMPK en tant que régulateur négatif de mTORC1 et de l'ACC dans la stimulation de la différenciation des LTCD4 en Treg (Figure 20).

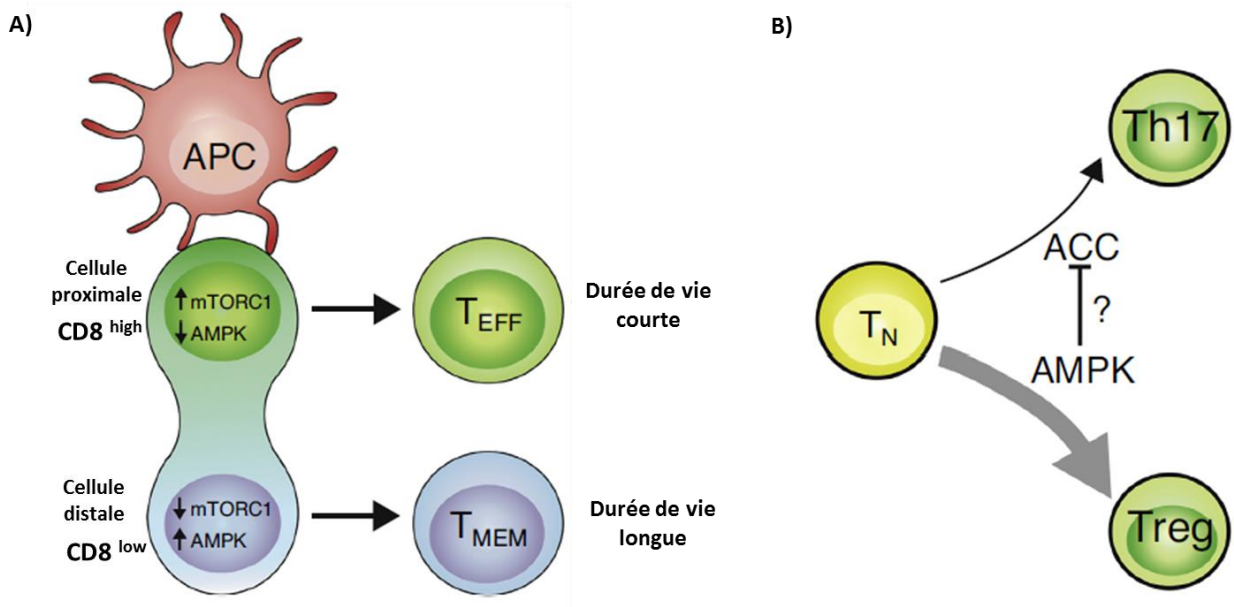


Figure 20 : régulation de la différenciation lymphocytaire par l'AMPK

A) La ségrégation asymétrique des régulateurs métaboliques pendant la division des lymphocytes peut orienter leur différenciation. Les LTCD8^{high} (vert) expriment fortement mTORC1 et sont orientés vers une différenciation en Teff (LT effectrices). Les cellules CD8^{low} (bleu) expriment un faible taux de mTORC1 et sont orientés vers une différenciation en Tmem (LT memoires). La ségrégation différentielle de l'AMPK au cours de la différenciation des LTCD8 peut réguler leur devenir via la régulation de mTORC1 et /ou le profile métabolique. B) L'activité de l'ACC est nécessaire pour la différenciation des LTCD4 en Th17 (LT auxiliaire). En inhibant l'ACC, l'AMPK peut favoriser la différenciation des LTCD4 en Treg (LT régulateur).

(3) AMPK et différenciation macrophagique

La différenciation monocytaire est le processus qui permet la formation des monocytes à partir des GMP en présence de CSF-2 (GM-CSF), de CSF-1 (M-CSF), d'IL-3 ou d'IL-6.
Les GMP se différencient dans la moelle osseuse en monoblastes puis en promonocytes et enfin en monocytes immatures. Ces derniers migrent vers la circulation sanguine pour donner les monocytes matures. En absence de différenciation les monocytes circulants ont une demi-vie courte. Une fois stimulés par une réponse inflammatoire les monocytes activent les voies de survie et migrent dans les tissus pour se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques (Geissmann et al., 2010) .
Il a été démontré que l'activation d'une autophagie dépendante de ULK1 est nécessaire pour la différenciation macrophagique médiée par le CSF-1 (Jacquel et al., 2012). Le mécanisme moléculaire requit pour l'induction de ce processus implique une induction de l'expression de l'AMPK ainsi que son activation par la CaMKKβ (Obba et al., 2015). En effet, dans les monocytes, la stimulation du P2RY6 par le CSF-1R induit l'activation de la CaMKKB (via PLCB3 et l'augmentation du taux de Ca^{++}) qui active à son tour l'AMPK. ULK1 est alors activé par AMPK permettant ainsi l'induction de l'autophagie nécessaire à la différenciation macrophagique (Figure 21).

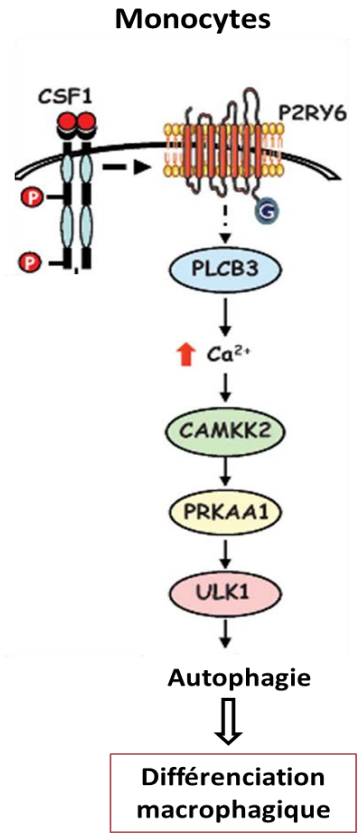


Figure 21 : schéma des voies de signalisation impliquées dans la différenciation macrocytaire induite par le CSF-1. Adaptée de (Obba et al., 2015)

La liaison su CSF-1 à son récepteur CSF-1R induit l'activation de la voie P2RY6-PLCB3-CAMKKB-PRKAA1(AMPK)-ULK1 ce qui conduit à l'induction de l'autophagie nécessaire à la différenciation des monocytes.

(4) AMPK et globules rouges

Le rôle de l'AMPK dans la différenciation érythroïde n'a pas encore été étudié, cependant plusieurs travaux ont démontré l'implication de l'AMPK dans le maintien de la survie et de l'intégrité des globules rouges murins. Il a été rapporté que les GR murins expriment majoritairement les sous-unités α1, β1 et γ1 et que les souris déficientes en l'une de ces sous-unités, *Ampk α1* $^{-/-}$ (Föller et al., 2009) (Foretz et al., 2010a) ou *Ampk β1* $^{-/-}$ (Cambridge et al., 2017) ou *Ampk γ1* $^{-/-}$(Foretz et al., 2011a) présentent une anémie hémolytique due à une anomalie de globules rouges. En effet, les GR de ces souris n'ont pas d'anomalies morphologiques, cependant ils présentent une anisocytose et une augmentation de la résistance au choc osmotique ainsi qu'une déformabilité réduite ce qui a pour conséquence l'élimination précoce de ces GR anormaux par phagocytose. Afin de compenser l'anémie, les souris *Ampk α1* $^{-/-}$, *Ampk β1* $^{-/-}$ et *Ampk γ1* $^{-/-}$ développent une érythropoïèse de stress au niveau de la rate.

Afin de tester si les défauts observés au niveau des globules rouges sont dus à un défaut d'expression des marqueurs membranaires. Une analyse par coloration au bleu de coomassie de l'expression des protéines du cytosquelette membranaire (α et β spectrine, band3, ankIrine, protéine 4.1, 4.2 et β-actine) des GR issus de souris *wt* ou *Ampk γ1* $^{-/-}$ a été réalisée. Aucun changement dans l'expression de ces protéines n'a été observé, cependant, une augmentation de la phosphorylation de l'adducine a été détectée. L'implication de cette phosphorylation dans le phénotype des GR issus de souris *Ampk α1* $^{-/-}$ n'a pas été démontrée (Foretz et al., 2011a).

D'autre part, il a démontré que les GR *Ampk α1* $^{-/-}$ ont une augmentation significative du taux de ROS (reactive oxygen species) et de protéines oxydées. Cela est dû à la diminution de l'expression des enzymes anti-oxydantes médié par Foxo3. De plus, il a été observé que le traitement des souris *Ampk α1* $^{-/-}$ avec un antioxydant améliore la survie des érythrocytes (Wang et al., 2010a).

Une autre étude complémentaire à la précédente a démontré que l'absence de l'*Ampk α1* dans les GR induit une diminution de la phosphorylation de ULK1 et l'inhibition de l'autophagie. Cela conduit une accumulation de mitochondries déficientes qui ne peuvent pas être éliminées ainsi qu'une augmentation de la production de ROS, ce qui a pour conséquence l'hémolyse des érythrocytes (Zhu et al., 2014). Ces résultats soulignent le rôle de l'AMPK dans la régulation de la mitophagie nécessaire à la maturation des érythrocytes.

Il est connu que les GR anormaux ou sénescents expriment à leur surface des PS (phosphatidylserine) permettant leur reconnaissance sélective par les macrophages et leur phagocytose dans le système réticulo-endothélial (rate, foie et moelle osseuse). Il a été démontré que le taux de PS exposées à la surface des GR déficients en *Ampk α1* est plus élevé par rapport aux GR contrôles. Afin d'étudier le mécanisme moléculaires impliqués dans l'induction de la mort des GR *Ampk α1* $^{-/-}$ (éryptose). Une analyse protéomique globale des érythrocytes issus de souris contrôles ou *Ampk α1* $^{-/-}$été réalisée. Une diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique PAK2 (p21-activated kinase 2) a été observée dans les GR *Ampk α1* $^{-/-}$. De plus, l'inactivation de cette protéine dans les GR normaux (humains et murins) conduit à phénotype éryptotique similaire à celui observé dans les GR *Ampk α1* $^{-/-}$. Cette étude suggère un rôle de PAK2 dans l'apoptose des érythrocytes déficients en AMPK (Zelenak et al., 2011).

VII. Objectif

L'AMPK est impliquée dans la différenciation de plusieurs types cellulaires. Son rôle dans le maintien de l'homéostasie énergétique des cellules souches hématopoïétiques et dans la différenciation des lymphocytes T et des monocytes a été décrit. De plus, plusieurs travaux ont démontré un rôle de l'AMPK dans le maintien de la survie et de l'intégrité des globules rouges murins. En effet, les souris invalidées pour *Ampk α1*, *β1,* ou *γ1* présentent une anémie hémolytique due à une anomalie des globules rouges (augmentation de la résistance au choc osmotique et déformabilité réduite). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que les altérations observées dans les érythrocytes murins déficients en *Ampk* pourraient se mettre en place au cours du processus de différenciation des érythroblastes suggérant ainsi un rôle de l'AMPK dans l'érythropoïèse murine.

D'autre part, chez l'homme, l'utilisation d'activateurs directs de l'AMPK est envisagée pour le traitement thérapeutique de plusieurs syndromes métaboliques et de cancers dont les LAM. En effet, une étude réalisée au laboratoire a démontré l'intérêt d'utiliser l'activateur direct de l'AMPK, le GSK621, afin d'induire la mort des blastes de LAM. Ainsi, il nous semblait intéressant d'étudier les conséquences de l'utilisation de ces activateurs directs sur l'érythropoïèse normale humaine.
Le but de mon projet de thèse est donc d'étudier le rôle de l'AMPK dans l'érythropoïèse adulte murine et humaine.

Nous avons utilisé un système de culture liquide *ex vivo* des érythroblastes murins et humains. Chez la souris, les proérythroblastes sont obtenus à partir de moelle osseuse. Chez l'homme, les érythroblastes sont produits à partir de cellules CD34+ issues de sang mobilisé au G-CSF.
Ainsi, chez la souris nous avons étudié l'effet de l'absence de l'AMPK sur les progéniteurs et les précurseurs érythroïdes issus de souris contrôles ou *Ampkα1*$^{-/-}$. L'effet de l'activation de l'AMPK par des activateurs directs sur les précurseurs érythroïdes a été évalué.
Chez l'homme, nous avons déterminé l'expression et l'activation de l'AMPK au cours de l'érythropoïèse. L'effet de l'absence (shRNA AMPKα1) ou l'activation de l'AMPK (activateurs directs) sur la prolifération, la survie et la différenciation des précurseurs érythroïdes a également été étudié.

Résultat I et discussion

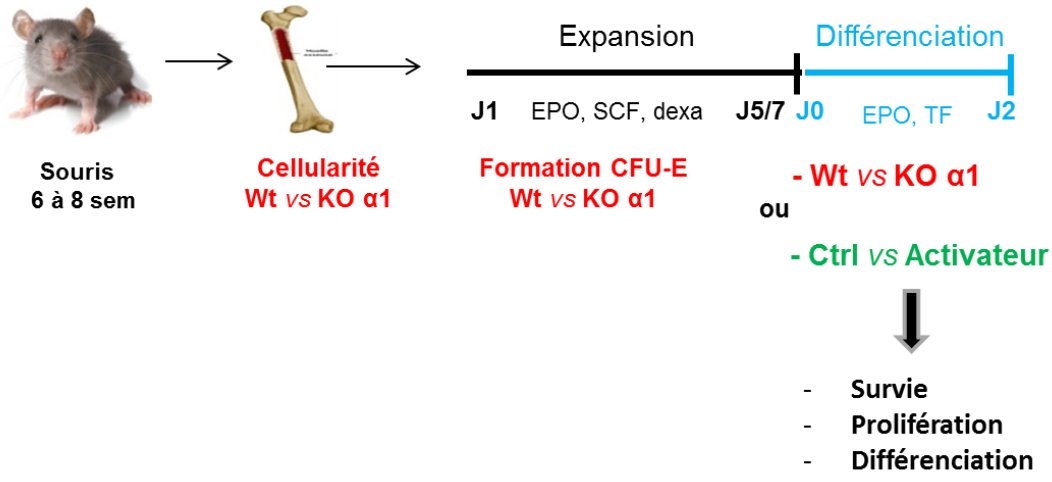
VIII. Résultats (partie I): Rôle de l'AMPK dans l'érythropoïèse murine adulte

Modèle cellulaire

Les cellules obtenues à partir de la moelle osseuse de souris ont été maintenues en phase d'expansion en présence d'EPO, de SCF et de déxamethasone. Après 5 à 7 jours de culture, une population d'érythroblastes précoces (CFU-E/proérythroblastes) est obtenue. Ces cellules sont induites en différenciation pendant 2 jours en présence d'EPO et de ferro-transferrine (Holo Tf).

Afin d'étudier l'effet de l'absence de l'AMPK, différents paramètres ont été comparés entre les souris contrôles et *Ampkα1*$^{-/-}$. À savoir, la cellularité et la différenciation des progéniteurs érythroïdes ainsi que la viabilité et la différenciation des précurseurs érythroïdes.

Pour étudier l'effet de l'activation de l'AMPK, la population d'érythroblastes précoces (CFU-E /proérythroblastes) obtenue a été cultivée pendant toute la phase de différenciation en présence de contrôle ou d'activateur direct de l'AMPK. Les cellules ont été quotidiennement diluées via un ajout partiel de milieu contenant le contrôle ou l'activateur de l'AMPK. La prolifération, la survie et la différenciation des précurseurs érythroïdes murins ont été comparées entre les deux conditions.



Culture d'érythroblastes murins *in vitro*

Effet de l'absence de l'AMPK

Il a été démontré que les GR murins expriment majoritairement les isoformes α1, β1 et γ1 et que la délétion de l'*Ampkα1*, *β1* ou *γ1* chez la souris conduit au même phénotype (anisocytose, anémie hémolytique et une splénomégalie). En effet, il a été démontré que l'absence de l'une des sous-unités de l'hétérotrimere engendre la déstabilisation du complexe et la dégradation des autres sous-unités. Aucune compensation de l'absence de α1, β1 ou γ1 par les autres isoformes n'a été observée dans le globule rouge.

Nous avons d'abord commencé par déterminer quelles isoformes catalytiques α1 ou α2 sont exprimées au cours de l'érythropoïèse murine et vérifier que l'absence d'α1 n'est pas compensée par une augmentation de l'expression de l'isoforme α2.

L'analyse par western blot des érythroblastes murins à différents stades de maturation érythroïde terminale (0h, 24h et 48h) démontre que l'isoforme α1 et pas α2 (exprimée uniquement dans le contrôle positif, cellules de foie de souris) est exprimée au cours de l'érythropoïèse de souris contrôles et de souris *Ampk α1*$^{-/-}$. Ce résultat indique que les érythroblastes expriment l'isoforme α1 et que son absence n'est pas compensée par l'expression de l'isoforme α2 (Figure 1).

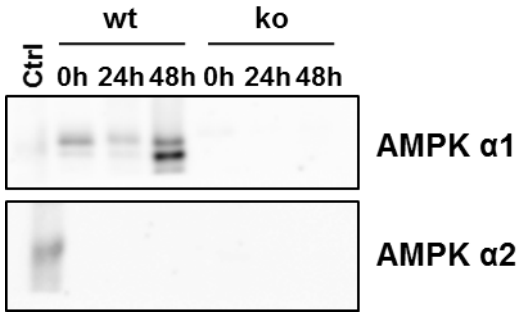


Figure 1 : AMPK α1 est la seule isoforme catalytique exprimée au cours de l'érythropoïèse murine

Des érythroblastes murins à différents stades de maturation érythroïde (0h, 24h, 48h) issus de souris contrôles ou *Ampkα1*$^{-/-}$ ont été lysés. L'expression des isoformes AMPK α1 ou α2 a été analysée par western blot en utilisant les anticorps spécifiques. Contrôle : cellules de foie de souris qui expriment les deux isoformes α1 ou α2.

Effet de l'absence de l'AMPK sur la cellularité de la moelle osseuse

Afin d'étudier l'effet de l'absence de l'AMPK sur la cellularité, le nombre de cellules obtenu à partir de moelle osseuse de souris contrôles a été comparé à celui obtenu à partir de moelle osseuse de souris *Ampka1*$^{-/-}$. Aucune différence n'a été observée suggérant que l'AMPK n'a pas d'effet sur le nombre de cellules de la moelle osseuse (figure 2)

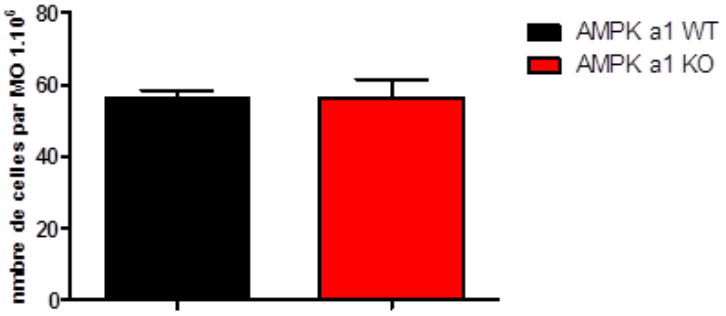


Figure 2 : **L'AMPK n'a pas d'effet sur la cellularité de la moelle osseuse**

Le nombre de cellules obtenu à partir de la moelle osseuse de souris contrôles (noire) a été comparé à celui obtenu à partir de la moelle osseuse de souris *Ampk a1* $^{-/-}$ (rouge) (WT n=21, KO n=16).

Effet de l'absence de l'AMPK sur la différenciation des progéniteurs érythroïdes

Nous avons par la suite réalisé un test clonogénique afin d'évaluer le nombre et la capacité de différenciation des progéniteurs érythroïdes de la moelle osseuse de souris contrôles et de souris *Ampka1*$^{-/-}$. Les cellules de moelle osseuse de souris contrôles ou *Ampkα1*$^{-/-}$ ont été ensemencées dans un milieu semi-solide en absence ou en présence de deux concentrations d'EPO (0.1 et 2U/ml). Les colonies (CFU-E) obtenues ont été comparées après 3 jours de culture.

Comme le montre la figure 3, le nombre de colonies CFU-E formé par les progéniteurs issus de souris *Ampka1*$^{-/-}$ est augmenté comparé aux souris contrôles. Ce résultat reflète la réponse compensatoire observée chez les souris *Ampkα1*$^{-/-}$

Ainsi l'absence de l'AMPK induit une augmentation de la capacité clonogenique des progéniteurs érythroïdes afin de compenser l'anémie.

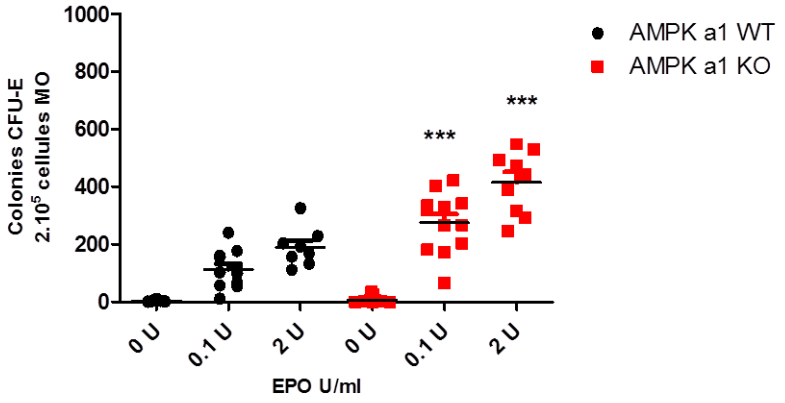


Figure 3: L'absence de l'AMPK induit une augmentation du nombre de CFU-E

2.10^5 cellules de moelle osseuse de souris contrôles ou *Ampka1*$^{-/-}$ ont été ensemencées dans un milieu semi-solide (methylcellulose) en présence de 0U, 0.1U ou 2U/ml d'EPO. Le nombre de colonies CFU-E est compté après 3 jours de culture. (wt n=12, ko n=12).

Effet de l'absence de l'AMPK sur la survie et la différenciation des précurseurs érythroïdes

Afin de savoir si les altérations observées dans les érythrocytes murins déficients en AMPK pourraient se mettre en place en amont, au cours du processus de différenciation des érythroblastes, nous avons étudié l'effet de l'absence de l'AMPK sur la survie et la différenciation terminale des érythroblastes issus de souris contrôles ou *Ampkα1*$^{-/-}$ du stade pro-E au stade réticulocyte.

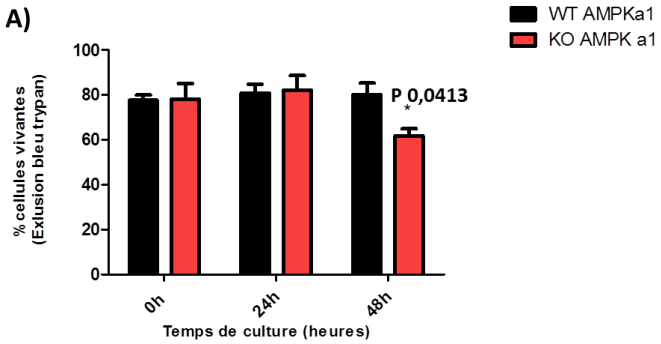
La viabilité cellulaire a été étudiée par le test d'exclusion au bleu trypan. Comme démontré dans la figure 4A, l'absence de l'AMPK n'a pas d'effet significatif sur la viabilité des érythroblastes comparé aux érythroblastes issus de souris contrôle.

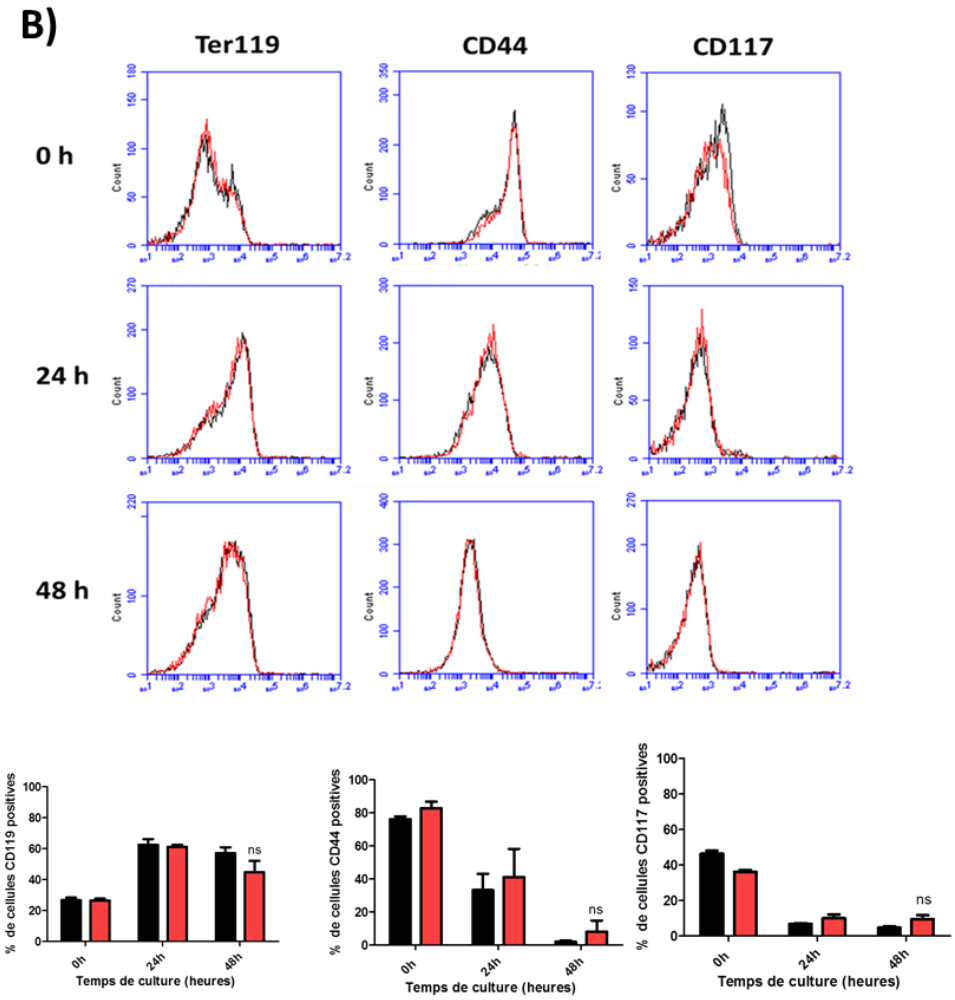
La différenciation des érythroblastes a été étudiée d'une part par l'analyse de l'expression des marqueurs membranaires Ter119, CD44 et CD117 par cytométrie en flux. D'autre part, par la mesure de l'hémoglobinisation des cellules par une coloration à la benzidine.

En ce qui concerne l'expression des marqueurs membranaires, la figure 4B montre que, quel que soit le stade de différenciation, il n'existe aucune variation dans l'expression des trois marqueurs en présence ou en absence de l'AMPK.

De même, d'après la figure 4C aucune variation significative du taux de cellules hémoglobinisées n'est observée en présence ou en absence de l'AMPK.

Ces résultats indiquent que l'AMPK n'a pas d'effet sur la survie et la différenciation des précurseurs érythroïdes murins.





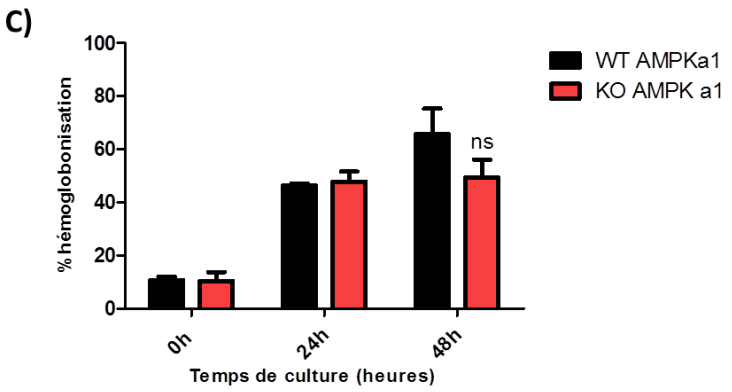


Figure 4 : l'absence de l'AMPK n'a pas d'effet sur les érythroblastes

La survie, l'hémoglobinisation et l'expression des marqueurs membranaires des érythroblastes issus de souris contrôles (noirs) ou de souris *Ampkα1*$^{-/-}$ (rouges) ont été comparées au cours des 48h de différenciation érythroïde murine. n=3.

A) Etude de la viabilité cellulaire par le test d'exclusion au bleu trypan. **B)** Figure représentative de l'étude de la différenciation érythroïde par analyse de l'expression des marqueurs membranaires Ter119, CD44 et CD117 par cytométrie en flux. Les histogrammes représentent les pourcentages des cellules Ter119+, CD44+ et CD117+ par rapport au nombre de cellules total au cours de la différenciation (0h, 24h, 48h) obtenus à partir des 3 expériences. **C)** Etude de l'hemoglobinisation cellulaire par coloration à la benzidine. Le taux de différenciation est exprimé en pourcentage de cellules hémoglobinisées par rapport au nombre de cellules total.

Effet de l'activation de l' AMPK

La deuxième partie consiste en l'étude de l'effet de l'activation de l'AMPK sur les érythroblastes murins.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que le GSK621, induit une activation de l'AMPK dans les érythroblastes murins. L'analyse par western blot indique que le GSK621 (à 30 et 100µM) entraine de façon dose dépendante, la phosphorylation de l'AMPK sur la T172 et son activation comme démontré par la phosphorylation de ses principales cibles ACC sur la S79 et ULK1 sur le S555 (Figure 5).

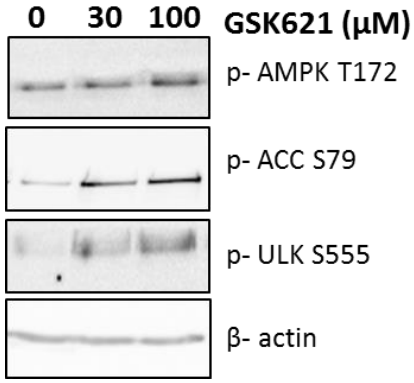


Figure 5 : Le GSK621 induit l'activation de l'AMPK dans les érythroblastes murins.

Des érythroblastes murins ont été incubés pendant 3h avec le contrôle ou avec 30 ou 100µM de GSK621. La phosphorylation et l'activation de l'AMPK ont été observées en analysant les extraits protéiques par western blot, en utilisant des anticorps anti p-AMPK T172, anti p-ACC S79 et anti p-ULK S555. L'anticorps anti β-actine a été utilisé comme contrôle de charge.

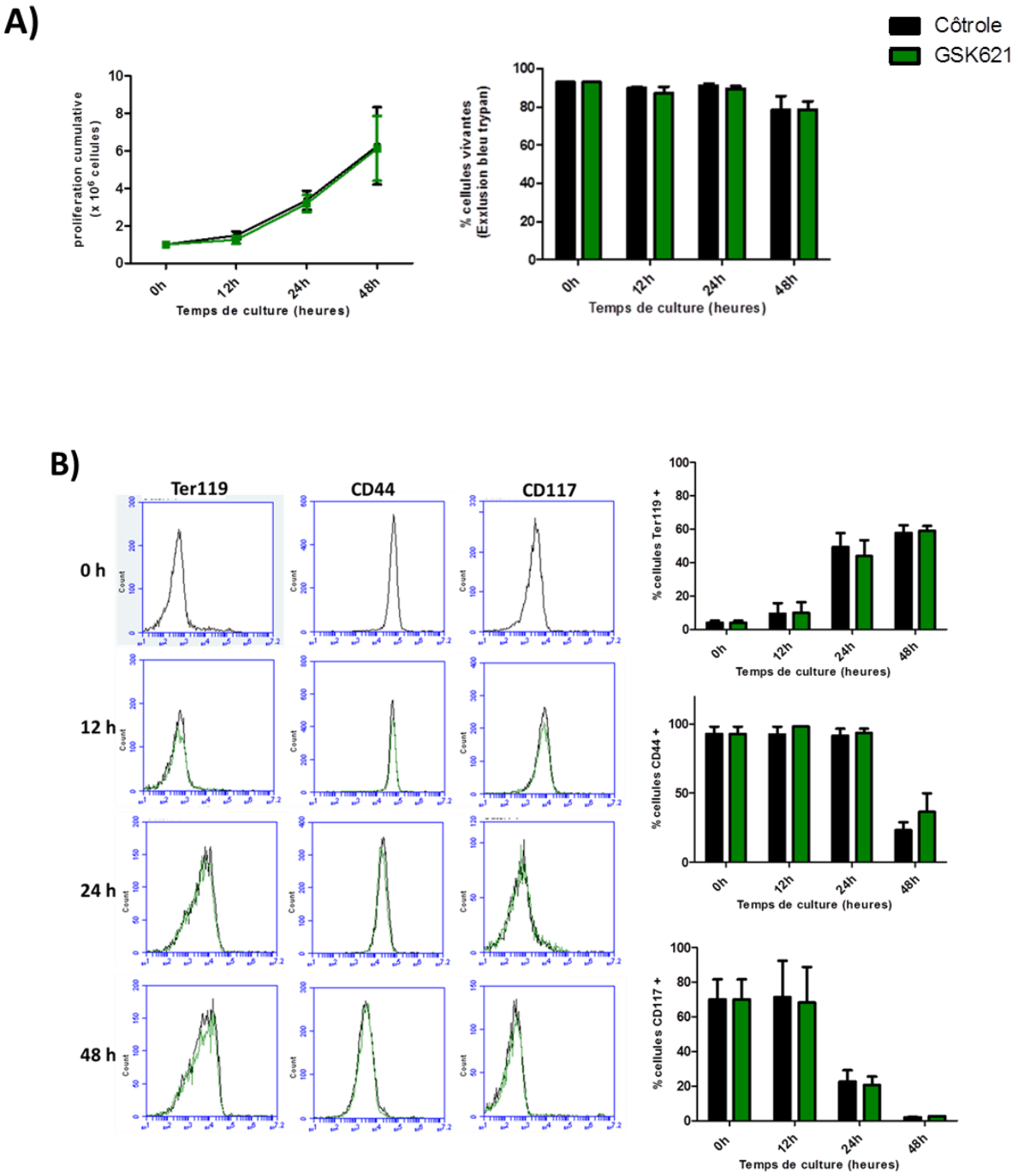
Afin d'étudier l'effet de l'activation de l'AMPK, la prolifération, la survie et la différenciation des précurseurs érythroïdes murins traités avec 30µM de GSK621 ont été comparés aux érythroblastes traités avec le contrôle (DMSO).

La prolifération et la survie cellulaire ont été analysées par le test d'exclusion au bleu trypan. La figure 6A montre que l'activation de l'AMPK n'a aucun effet sur la survie et la prolifération des érythroblastes. En effet, aucune variation n'est observée entre les érythroblastes traités par le GSK621 comparé aux érythroblastes traités avec le contrôle.

Concernant l'étude de l'effet de l'activation de l'AMPK sur la différenciation des érythroblastes. L'analyse de l'expression des marqueurs membranaires Ter119, CD44 et CD117 par cytométrie en flux ne démontre aucune variation quel que soit le stade de maturation des érythroblastes traités ou pas avec le GSK621 (Figure 6B).

L'absence d'effet de l'activation de l'AMPK sur la différenciation a été confirmée par l'analyse de l'hémoglobinisation cellulaire. En effet, aucune différence n'a été observée entre les deux conditions comme le démontre la figure 6C.

Les mêmes résultats ont été obtenus en utilisant la dose de 100µM de GSK621 ou en utilisant d'autres activateurs directs de l'AMPK, l'A-769662 (25 et 100µM) ou le C 991 (1, 5 et 10µM) (figures non montrées).


A)
Côtrole
GSK621
proliferation cumulative (x 10^6 cellules)
Temps de culture (heures)
% cellules vivantes (Exclusion bleu trypan)
Temps de culture (heures)
B)
Ter119
CD44
CD117
0 h
12 h
24 h
48 h
% cellules Ter119 +
Temps de culture (heures)
% cellules CD44 +
Temps de culture (heures)
% cellules CD117 +
Temps de culture (heures)

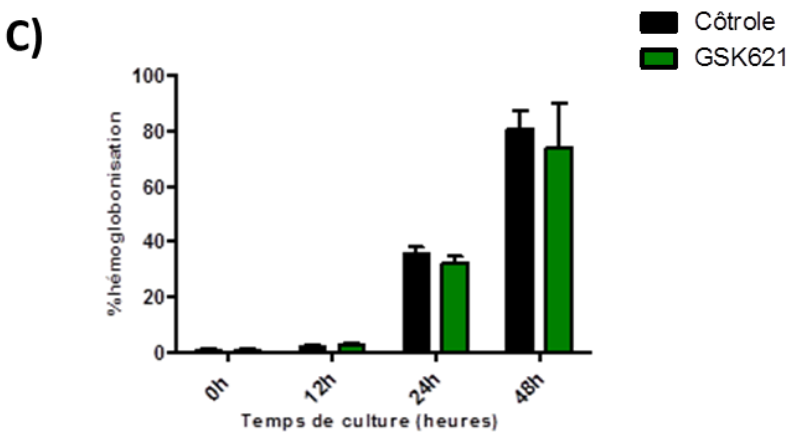


Figure 6 : l'activation de l'AMPK par le GSK621 n'a pas d'effet sur les érythroblastes

La prolifération, la survie, l'hémoglobinisation et l'expression des marqueurs membranaires des érythroblastes contrôles (noirs) ou traités avec 30µM d'activateur direct de l'AMPK, le GSK621 (verts) ont été comparées au cours des 48h de différenciation érythroïde murines. n=3.

A) Etude de la prolifération et de la viabilité cellulaire par le test d'exclusion au bleu trypan. **B)** panneaux de gauche, figure représentative de l'étude de la différenciation érythroïde par analyse de l'expression des marqueurs membranaires Ter119, CD44 et CD117 par cytométrie en flux. Panneaux de droite, pourcentage des cellules Ter119+, CD44+ et CD117+ par rapport au nombre de cellules total au cours de la différenciation (0h, 12h, 24h, 48h). **C)** étude de l'hémoglobinisation cellulaire par coloration à la benzidine. Le taux de différenciation est exprimé en pourcentage de cellules hémoglobinisées par rapport au nombre de cellules total.

IX. Conclusion, discussion et perspectives (partie I)

Plusieurs travaux ont démontré un rôle de l'AMPK dans le maintien de la survie et l'intégrité des globules rouges murins. En effet, les souris invalidées pour *Ampk α1*, *β1,* ou *γ1* présentent une anémie hémolytique due à une anomalie des globules rouges (augmentation de la résistance au choc osmotique et déformabilité réduite). Cette anémie est compensée par une érythropoïèse de stress qui se développe au niveau de la rate (Föller et al., 2009) (Foretz et al., 2010a) (Cambridge et al., 2017) (Foretz et al., 2011). Notre but était de déterminer si les altérations observées au niveau des globules rouges des souris invalidées pour l'*Ampk* se mettent en place au cours de l'érythropoïèse.

Par un test clonogénique nous avons démontré que l'absence de l'AMPK induit une augmentation de la capacité de prolifération et de différenciation des progéniteurs érythroïdes (CFU-E) de la moelle osseuse. Cette augmentation est probablement le reflet de l'érythropoïèse de stress développée chez les souris *Ampk-/-* qui induit une élévation de la concentration d'EPO et par conséquence la survie et prolifération d'un nombre plus important de CFU-E, comme ce qui est classiquement observé en cas d'anémies (Amireault et al., 2011). Cependant, nous ne pouvons pas exclure un effet direct dû à l'absence de l'AMPK. En effet on pourrait suggérer un rôle de l'AMPK dans la régulation de la prolifération des progéniteurs érythroïdes précoces et ainsi leur proportion dans la moelle osseuse.

D'autre part, nous avons étudié l'effet de l'absence de l'AMPK sur l'érythropoïèse murine en comparant la différenciation des érythroblastes issus de souris invalidées pour l'*Ampk α1* par rapport aux souris contrôles. Pour cela, nous avons choisi de réaliser des cultures *ex vivo*. En effet, il nous semblait important d'étudier l'érythropoïèse de la moelle osseuse *ex vivo* en dehors d'une érythropoïèse de stress, de manière à démasquer les défauts qui pourraient être compensés par le microenvironnement et l'augmentation de la concentration d'EPO.

Les résultats que nous avons obtenus ont démontré que l'activation ou l'absence de l'AMPK ne semble pas avoir d'effet sur l'érythropoïèse murine. En effet, dans notre système de culture *in vitro*, la prolifération et la différenciation des érythroblastes cultivés en présence d'activateurs directs d'AMPK ainsi que les érythroblastes *Ampk α1*$^{-/-}$ sont identiques à celles des érythroblastes contrôles. De plus, une analyse de protéomique globale (Label-free), réalisée à différents stades de maturation érythroïde, n'a montré aucune variation significative

de l'expression des protéines entre les érythroblastes contrôles et les érythroblastes déficients pour l'*Ampk* (résultats non montrés).

Afin de renforcer nos résultats, nous avons souhaité étudier en parallèle l'effet de l'absence ou de l'activation d'AMPK dans un autre modèle cellulaire : les cellules Medep. Les Medep sont des cellules érythroïdes murines, issues de cellules ES, qui peuvent être induites en différenciation en présence d'EPO (Hiroyama et al., 2008). Au laboratoire, nos expériences ont montré que ces cellules constituent un très bon modèle de différenciation érythroïde, proche de celle obtenue à partir d'érythroblastes primaires murins. Ainsi, nous avons invalidé le gène *Prkaa1* (codant pour AMPKα1) dans ces cellules par la méthode CRISPR/Cas9 afin de comparer la différenciation des cellules Medep contrôles et des cellules Medep *Ampkα1*$^{-/-}$ (ces analyses sont actuellement en cours). Nous étudierons également l'effet de l'activation de l'AMPK en comparant la différenciation des cellules Medep en présence ou en absence d'activateurs directs de l'AMPK.

Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses pour expliquer l'absence d'effet de la modulation de l'activité de l'AMPK chez les érythroblastes murins *in vitro*.

Premièrement, nous pouvons supposer l'existence d'un éventuel système qui permettrait de compenser l'absence de l'AMPK au cours de l'érythropoïèse murine.

Deuxièmement, AMPK pourrait avoir un rôle de régulateur métabolique nécessaire uniquement en cas de stress énergétique. La mesure du taux d'ATP par chromatographie HPLC, au cours de l'érythropoïèse murine, a montré que la concentration d'ATP est constante (Kim et al., 1991). Nous pouvons donc faire l'hypothèse qu'au cours de leur différenciation, les érythroblastes produisent une quantité suffisante d'ATP et ne nécessitent donc pas d'activation de l'AMPK. De plus, d'autres travaux ont analysé l'expression de plusieurs gènes du métabolisme par la technologie microfluidique développé par Fluidigm et n'ont montré aucune différence entre les érythroblastes immatures et matures (Zhang et al., 2014). Ainsi, il serait intéressant de mesurer dans notre système de culture *in vitro* le taux d'ATP et certains paramètres métaboliques des érythroblastes *wt* et *Ampk*$^{-/-}$ (métabolisme glucidique, lipidique). D'autre part, afin de tester cette hypothèse, il serait également intéressant d'induire un stress énergétique en cultivant les cellules dans un milieu dépourvu de glucose par exemple, et d'étudier l'effet de ce stress sur les érythroblastes *Ampk*$^{-/-}$ qui ne seront pas capables d'activer AMPK pour rétablir la balance énergétique.

Troisièmement, nous pouvons suggérer que l'AMPK n'ait pas de rôle au cours de la différenciation érythroïde murine mais qu'elle soit impliquée dans l'induction de l'autophagie

au stade réticulocyte. En effet, des travaux ont montré qu'une partie des réticulocytes issus de souris *Ampkα1*$^{-/-}$ présentent un défaut d'élimination des mitochondries et une augmentation de production des ROS (Zhu et al., 2014). Ils ont ainsi suggéré que les défauts observés au niveau des GR n'exprimant pas AMPK pourraient être dus à la rétention de mitochondries, altérant leur déformabilité et induisant leur hémolyse suite à l'accumulation de ROS produits par ces mitochondries déficientes. Afin de tester cette hypothèse, nous analyserons par mitotracker ou par microscopie électronique les réticulocytes obtenus en culture *in vitro* à partir d'érythroblastes déficients pour l'*Ampk* afin d'observer s'ils présentent également un défaut d'élimination des mitochondries. Nous mesurerons la quantité de ROS produits dans les réticulocytes en présence ou en absence de l'AMPK.

Enfin, le rôle de l'AMPK pourrait aussi être restreint au maintien de la survie et de l'intégrité des GR. Dans ce cas, il serait intéressant de réaliser une étude de phospho- protéomique globale en utilisant des activateurs directs de l'AMPK, afin de mettre en évidence d'éventuels substrats de l'AMPK au niveau du globule rouge.

De plus, il existe chez l'homme plusieurs anémies hémolytiques secondaires à une anomalie de membrane du globule rouge, par exemple, la xérocytose héréditaire qui est caractérisée par une perméabilité membranaire aux cations Na^+ et K^+ et une augmentation de la résistance au choc osmotique comme décrite chez les souris *Ampk*$^{-/-}$. La ressemblance phénotypique entre les GR des souris *Ampk*$^{-/-}$ et ceux des patients atteints de xérocytose héréditaire est notable et il serait intéressant d'étudier de potentielles connexions moléculaires entre les deux.

Matériel et méthodes

X. Matériel et méthodes (partie I)

Modèle animal

Les souris utilisées ont un fond génétique mixte 129 Sv et C57BL/6. Les souris *Ampkα1*$^{-/-}$ ont une perte totale de l'expression de l'*Ampkα*1.

Culture des érythroblastes murins *in vitro*

Les cellules de moelle osseuse de souris (âgées de 6 à 8 semaines) sont cultivées dans du milieu StemPro34 complémenté de nutrient (*Life technologie* 10640-019), 1% de glutamine (2mM *Gibco*®), 100U/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine

La totalité des cellules extraites de la moelle osseuse (40.10^6 à 60.10^6) est maintenue en phase d'expansion dans 2ml de milieu en présence de 100ng/ml de SCF murin (*Immunotools*), 1U/ml d'EPO humaine recombinante (*Roche*) et de 1µM de dexamethasone (S*igma* D8893). Elles sont centrifugées quotidiennement à 200g pendant 10min afin d'éliminer les cellules mortes. Après 5 jours de culture, une population de CFU-E/ Pro-E est obtenue. Ces cellules sont induites en différenciation en changeant de cytokines. Elles sont ainsi cultivées en présence de 2U/ml d'EPO et 1mg/ml d'holotransferrine humaine (*Roche*). Une population de réticulocytes est obtenue après 48h de différenciation. Pendant cette 2ème phase de différenciation la concentration des cellules est quotidiennement ajustée à $1x10^6$ /ml via un ajout partiel de milieu.

Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 37°c dans une atmosphère humide contenant 5% de CO2.

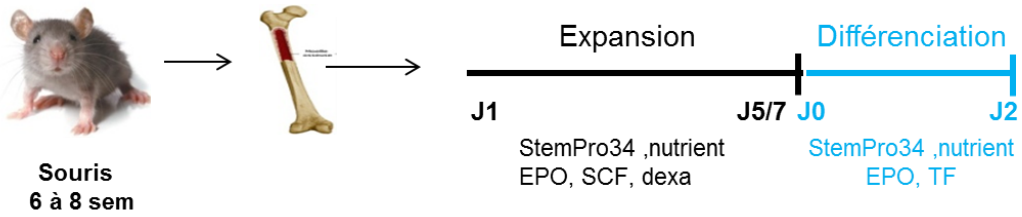


Figure 1 : Culture d'érythroblastes murins *in vitro*

Mesure de la prolifération et la viabilité cellulaire

Le comptage des cellules se fait par le test d'exclusion au bleu Trypan (Sigma-Aldrich) en utilisant une cellule de Malassez. Les cellules nécrotiques ou apoptotiques sont perméables et colorées en bleu.

Mesure de la différenciation érythroïde

Mesure de la synthèse de l'hémoglobine - coloration benzidine

Les cellules sont mélangées volume à volume avec une solution de dihydrochloride Benzidine (*Sigma*) 0.1%+ 0.3% H_2O_2 à température ambiante. Le comptage est fait sur une cellule de Kova Slide au microscope optique. Les cellules hémoglobinisées sont colorées en bleu plus ou moins foncé selon la quantité d'hémoglobine présente dans la cellule. Le taux de différenciation est exprimé en pourcentage de cellules hémoglobinisées par rapport au nombre de cellules total.

Analyse de l'expression des marqueurs membranaires - cytométrie en flux

30 000 cellules sont lavées avec 200µL de tampon facs contenant du DPBS 1X, SVF2% et azide 0.1%, puis centrifugées pendant 1min à 400g. Les cellules sont incubées dans l'obscurité pendant 20 min à 4°C avec les anticorps dirigés contre les marqueurs de surface cellulaire murins (tableau 2). Une fois marquées, les cellules sont à nouveau lavées 2 fois avec le tampon facs, puis reprises dans 150µl du même tampon avant d'être analysées.
L'analyse a été effectuée en utilisant le cytomètre de flux Accuri C6, BD-Pharmingen. Le traitement des données est réalisé avec le logiciel CFlow plus BD- Pharmingen.

Anticorps	Fluorochrome	Caractéristiques	Référence	Dilution
c-Kit (CD117)	APC	IgG2b,κ de rat anti-CD117 murin	553356 – BD Pharmingen	1/50
Ter119	PE	IgG2b,κ de rat anti-Ter119 murin	553673 – BD Pharmingen	1/25
CD44	PE-Cy7	IgG1,κ de rat anti-CD44 murin	560569– BD Pharmingen	1/100
Isotype contrôle	APC	IgG2b,κ de rat	553991 – BD Pharmingen	1/50
Isotype contrôle	PE	IgG2b,κ de rat	553989 – BD Pharmingen	1/25
Isotype contrôle	PE-Cy7	IgG1,κ de rat	552849– BD Pharmingen	1/100

Tableau 3 : anticorps utilisés pour la cytométrie en flux

Analyse clonogénique

Les cellules de la moelle osseuse de souris contrôles ou *Ampkα1*$^{-/-}$ sont ensemencées en duplicate dans un milieu semi-solide, méthyl-cellulose (M3234 StemCell) à 2.10^5 cellules/condition. Le milieu est supplémenté par différentes concentrations d'EPO recombinante humaine (0U, 0.1U ou 2U/mL). Les colonies CFU-E obtenues sont dénombrées après 3 jours de culture.

Biochimie

Préparation d'extraits cellulaires

Les cellules sont centrifugées à 400g, 5min puis lavées 1 fois avec du PBS à température ambiante.

Le culot cellulaire est lysées dans du tampon de Laemmli 1X (0.625 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% SDS, 5 % glycerol, 1mmol/L vanadate ; 0,002% de bleu de bromophénol, 40mmol/L Dithiothreitol (DTT)). L'échantillon est mis à bouillir pendant 5 minutes à 95°C.

Western blot

Les lysats cellulaires ($0{,}3.10^6$ de cellules/ puits) sont déposés sur gel de polyacrylamide (Tampon de concentration : SDS 0.4%, Tris 0,5M, H2O, HCl qsp pH 6.8. Tampon de séparation : Tris 1,5M, SDS 0,4%, H2O, HCl qsp pH 8,8.) et séparés par migration électrophorétique en conditions dénaturantes à 150 V, 45mA pendant 1h. Les protéines ainsi séparées sont transférées sur une membrane de nitrocellulose à 100V, 4°C pendant 1h15. L'efficacité du transfert est contrôlée par coloration au rouge ponceau. Afin de bloquer les sites de fixation non spécifiques, la membrane est saturée dans du TBS- tween (25 mM Tris ph 8.6, 137 mM NaCl, 3 mM KCl –Tween 0,1% (0.05% Tween 20X, *SIGMA*)) lait 5% pendant 1h à température ambiante. La membrane est incubée avec un anticorps primaire dirigé contre la protéine à étudier (tableau 3), dilué en TBS-T lait 5% sous agitation une nuit à 4°C. Après 3 lavages de 5min en TBS-Tween, la membrane est incubée sous agitation avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP) dilué en TBS-Tween lait 5% 1h à température ambiante puis lavée en TBS-T 3 fois. La révélation se fait avec le kit, (Amersham ECL™ prime Western Blotting Detection Kit, *GE Healthcare*®)

Le signal est détecté à l'aide d'une caméra CCD (LAS-3000 Imager, Fujifilm®) et les images sont traitées avec le logiciel software Fujifilm® Multi Gauge V 3.0.

Les membranes sont déshybridées (eau avec 1% d'acide acétique, 15 min sous agitation). Elles sont ensuite lavées 3 fois pendant 5 minutes en tampon TBS-tween et saturée pendant 1h dans du TBS-tween lait 5% avant d'être réhybridées avec un autre anticorps primaire.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Dilution
p-AMPK T172	Cell Signaling	2535S	1/1000
p-ACC S79	Cell Signaling	3661S	1/1000
p-ULK S555	Cell Signaling	5869S	1/1000
AMPK α1/α2	Pr.Hardie		1/5000
Actine	Sigma Aldrich	1978	1/10000
Anti-lapin	Cell Signaling	7074S	1/10000
Anti-souris	Cell Signaling	7076S	1/10000
Anti-mouton	Calbiochem	422100	1/10000

Tableau 4 : Anticorps utilisé pour le western blot

Résultat II et discussion

XI. Résultats (partie II): Rôle de l'AMPK dans l'érythropoïèse humaine adulte

A. Résumé de l'article

Dans cette deuxième partie nous nous sommes intéressés au rôle de l'AMPK au cours de l'érythropoïèse humaine. Les résultats obtenus ont été regroupés au sein d'un manuscrit destiné à être soumis prochainement à la revue *Haematologica.* Les principaux résultats qui y sont décrits sont résumés ci-dessous.

Modèle cellulaire

L'érythropoïèse normale humaine est étudiée dans des progéniteurs et précurseurs érythroïdes normaux obtenus à partir de cytaphérèse (sans mobilisé au G-CSF). Les progéniteurs hématopoïétiques $CD34^+$ sont isolés par tri magnétique puis amplifiés pendant 7 jours lors d'une première phase de culture. Les précurseurs érythroïdes sont ensuite triés sur l'expression du marqueur CD36 puis sont cultivés pendant 15 jours dans des conditions définies pour induire leur différentiation. L'expression et le rôle de l'AMPK sont étudiés au cours de cette deuxième phase de différenciation érythroïde.

Lors de la présentation des résultats :

-Les précurseurs (Pro-E – Baso1) exprimant faiblement la GPA (GPA^{low}) seront nommés : érythroblastes immatures.

-Les précurseurs (Baso2 – Acido-E) exprimant fortement la GPA (GPA^{high}) seront nommés : érythroblastes matures.

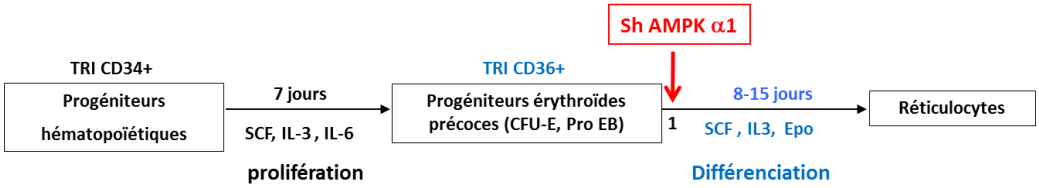
Expression et activation de l'AMPK au cours de l'érythropoïèse humaine

Nos travaux montrent que seules les isoformes α1, β1 et ɣ1 d'AMPK sont exprimées et varient peu au cours de la différentiation. La phosphorylation de l'AMPK sur le résidu Thr172, marqueur de son activité, et la phosphorylation d'une de ses cibles l'ACC sur le résidu Ser79 sont élevées dans les érythroblastes immatures (Pro-E Baso1) puis diminuent au cours de la progression dans la différenciation érythroïde.

Rôle de l'AMPK dans l'érythropoïèse humaine

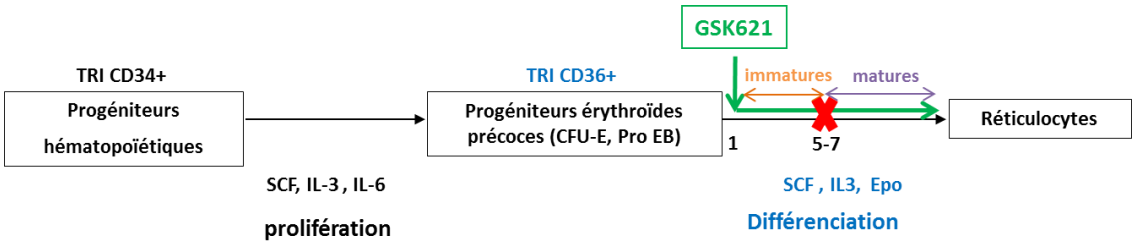
Afin de déterminer le rôle de l'AMPK dans l'érythropoïèse, nous avons suivi deux approches expérimentales. La première a consisté à étudier l'effet de l'inhibition de l'expression de l'AMPK par un sh ARN AMPKα1. La deuxième approche a consisté à utiliser des activateurs directs de l'AMPK (GSK621 et le 991) et d'évaluer les conséquences d'une activation de l'AMPK sur l'érythropoïèse.

Effet de l'absence de l'AMPK sur les érythroblastes humains



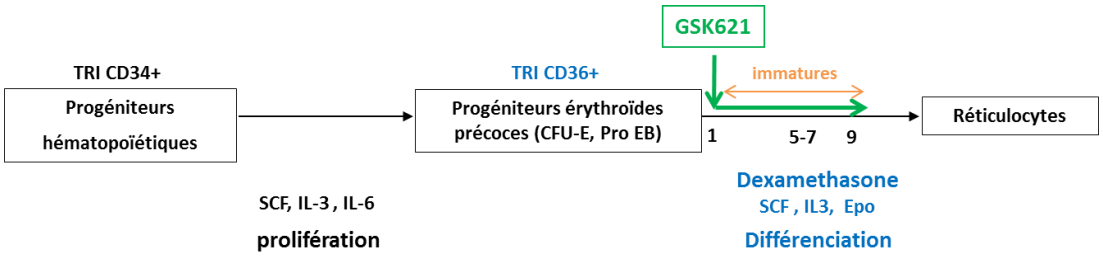
Nous avons montré que l'inhibition de l'expression de la sous-unité α1 de l'AMPK induit un ralentissement de la prolifération cellulaire et une anomalie de l'érythropoïèse révélée par une modification de l'expression des protéines membranaires à la surface des érythroblastes au cours de la différenciation. En effet, nous avons observé un retard dans l'acquisition de la GPA et une accélération de l'acquisition de Band3 et de la perte de l'intégrine α4.

Effet de l'activation de l'AMPK sur les érythroblastes humains

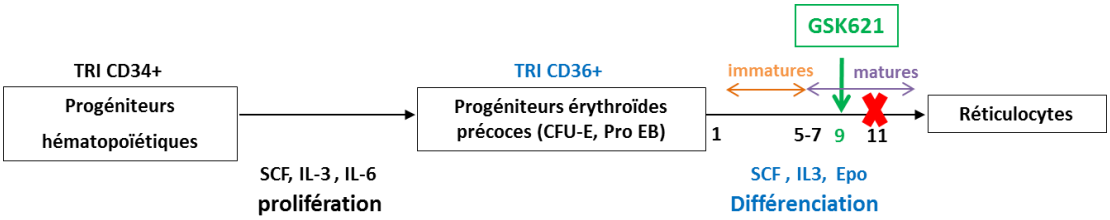


Nous avons montré que l'activation de l'AMPK par le GSK621 dans les progéniteurs érythroïdes précoces, et le maintien de cette activation au cours de la différenciation induit un blocage de la prolifération cellulaire en phase S, une induction de l'autophagie et l'apoptose des érythroblastes matures (GPA^{high}) conduisant à un arrêt de différenciation au stade Baso-E.

Afin de vérifier la spécificité des effets de l'activation de l'AMPK sur les érythroblastes matures, nous avons réalisé deux expériences.



D'une part, nous avons maintenu les érythroblastes à des stades précoces (CFU-E/Pro-E) pendant plusieurs jours grâce à de la dexamethasone. Nous avons ainsi démontré que l'activation de l'AMPK dans ces érythroblastes immatures n'a pas d'effet.



D'autre part, nous avons induit l'activation de l'AMPK dans des érythroblastes matures (poly-E), dans ce cas nous avons observé une rapide induction de l'apoptose et l'arrêt de la différenciation.

B. Article

Finely-tuned regulation of AMPK is crucial for human adult erythropoiesis

Meriem Ladli[1,2,3,4], Cyrielle Richard[1,2,3,4], Maria-Lilia Brassart[1,2,3,4] , Sarah Ducamp[1,2,3,4], Yael Zermati[1,2,3,4], Sabrina Bondu[1,2,3,4], , Pierre Sujobert[1,2,3], Jérôme Tamburini[1,2,3], Catherine Lacombe[1,2,3,4], Marc Foretz[1,2,3,4], Nabih Azar[5], Patrick Mayeux[1,2,3,4], Benoit Viollet[1,2,3,4], Frédérique Verdier[1,2,3,4*]

1- Institut Cochin, INSERM U1016, Paris, France , 2- CNRS UMR 8104, Paris, France, 3- Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, 4- Labex GREX, Paris France, 5-Service d'hémobiologie, hôpital La Pitié Salpétrière, Paris, France

C.R and ML.B contributed equally to the work.

*corresponding author

Key words: primary human erythroblasts, differentiation, AMPK

ABSTRACT

Erythropoiesis is the process which amounts to the production of red blood cells (RBCs). AMPK is a heterotrimeric complex containing α, β, and γ subunits, known for its role in the maintenance of cellular energy homeostasis. It has been shown that Ampk is involved in maintaining integrity of murine RBCs as well as their survival. Indeed, *Ampk α1*$^{-/-}$ and *Ampk γ1*$^{-/-}$ mice present a hemolytic anemia, and their RBCs show elasticity defects in their plasma membrane. As membrane elasticity is progressively acquired during RBCs maturation, the defect due to *Ampk* knockout is could be initiated during erythropoiesis. Therefore, we aim to study the role of AMPK during human erythropoiesis. In human primary erythroblasts, our data show that the knockdown of the α1 subunit expression by shRNA induces a slowing down of cell proliferation and defects in the differentiation of human erythroblasts, indicated by the shift in pattern of cell surface markers expression during differentiation. In addition, we showed that AMPK (Thr172) and its target ACC (Ser79) phosphorylation are elevated in immature (GPA^{low}) erythroblasts, and then decreased conjointly with the erythroid differentiation. AMPK activation in mature (GPA^{high}) erythroblasts through

the use of direct activators (GSK621 and 991) induces a cell cycle arrest in S phase, the induction of autophagy and a caspase-dependent apoptosis, whereas no such effect is observed in similarly-treated immature erythroblasts. Thus, our work suggests that AMPK activation during the final stages of erythropoiesis is deleterious. As the use of direct AMPK activators is being considered as therapeutic treatment in several pathologies (diabetes, AML), this observation is pivotal. Our data highlighted the importance of finely-tuned regulation of AMPK during adult human erythropoiesis.

INTRODUCTION

Mammalian AMPK is a highly conserved eukaryotic serine/threonine protein kinase and a heterotrimeric complex consisting of a catalytic (α) and two regulatory (β and γ) subunits, encoded by different genes (α1, α2, β1, β2, γ1, γ2, and γ3). In situations of energy depletion, a decrease in the cellular ATP-to-AMP ratio leads to AMPK activation allosterically by AMP, but also by phosphorylation of Thr172 within the activation loop segment of the α subunit by the upstream AMPK kinase LKB1. Another ‘‘canonical’’ activation mechanism involves the phosphorylation of Thr172 by CaMKKβ in response to a rise in intracellular Ca^{2+}. Once activated, AMPK phosphorylates metabolic targets leading to a decrease in ATP consumption and to an increase of ATP production. Particularly, AMPK inhibits fatty acid synthesis via inactivating phosphorylation of ACC (acetyl-Coa-Carboxylase) or induces autophagy via phosphorylation of ULK1 (Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1) (Hardie, 2011). Thus, AMPK is a major sensor of energy status that maintains cellular energy homeostasis but also exerts non-metabolic functions such as the maintenance of cell survival, cell polarity and the regulation of the cell cycle (Steinberg and Kemp, 2009; Williams and Brenman, 2008).

Erythropoiesis is a tightly regulated process that allows the production of around two millions red blood cells each second throughout a human life, while the total blood cells number has to remain within a narrow margin. This very dynamic process is quite flexible as it must rapidly increase its rate in response to blood loss, hypoxia, or anemia. Furthermore, homeostasis maintenance is crucial, and imbalanced erythropoiesis can lead to the development of erythroid pathologies like myelodysplastic syndromes (MDS) and anemias.

We previously demonstrated in mice that AMPK is playing a crucial role in the integrity and survival of red blood cells. We showed that mice globally deficient in the catalytic subunit AMPKα1, but not in those lacking the isoform AMPKα2, as well as those globally deficient in the regulatory subunit AMPKγ1, develop regenerative hemolytic anemia caused by increasing sequestration of abnormal erythrocytes. *Ampkα1$^{-/-}$* and *Ampkγ1$^{-/-}$* mice develop splenomegaly and iron accumulation due to a compensatory response through extramedullary erythropoiesis in the spleen and enhanced erythrophagocytosis. The life span of erythrocytes from *Ampkα1$^{-/-}$* and *Ampkγ1$^{-/-}$* mice is shortened compared to wild-type littermates. Moreover, *Ampkα1$^{-/-}$* and *Ampkγ1$^{-/-}$* erythrocytes are highly resistant to osmotic stress and poorly deformable in response to increasing shear stress, consistent with a loss of membrane elasticity (Foretz et al., 2010, 2011) (Wang et al., 2010).

In addition to the important role of AMPK in hematopoietic stem cell maintenance (Gan et al., 2010b; Gurumurthy et al., 2010b; Nakada et al., 2010b), the defects observed in AMPK-deficient erythrocytes suggest the alterations might occur early during terminal erythroid maturation, and prompted us to investigate whether AMPK could be involved in regulating the proliferation, survival and differentiation of human erythroid precursors.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

The anti-α1 and anti- α2 AMPK antibodies used for western blot were obtained from Graham Hardie (University of Dundee, Dundee, UK), anti-β1, β2, γ1, γ2 AMPK isoform antibodies, anti-P-ACC, anti-P-ULK1, and anti-HSC70 antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Anti-cleaved caspase 3 antibody was from Cell Signaling. Both the anti-Actin (A5441) antibody and the Chloroquine were purchased from Sigma-Aldrich. GSK-621 was purchased from Selleckchem, and 991 (5-[[6-chloro-5-(1-methylindol-5-yl)-1H-benzimidazol-2-yl]oxy]-2-methyl-benzoic acid) (CAS#: 129739-36-2) was synthesized by Spirochem.

Cell lines and Cell culture

$CD34^+$ cells were obtained from human donors who gave informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki Principles. G-CSF-mobilized $CD34^+$ cells were purified from peripheral blood after cytapheresis. $CD34^+$ cells were isolated by positive selection using an immunomagnetic procedure (MACS CD34 isolation Kit; Miltenyi Biotech, Bergish Badgach, Germany). $CD34^+$ cells were cultured in 5% CO_2 at 37°C for 7 days in Iscove IMDM containing 15% BIT 9500 (StemCell Technologies), 100ng/ml SCF, 10ng/ml IL6 and 10ng/ml IL3. After 7 days of culture, $CD36^+$ cells corresponding to a highly purified population of human erythroid progenitors were obtained by positive selection on CD36 immunomagnetic beads. $CD36^+$ cells were then cultured in the presence of 2U/mL Epo, 100ng/ml SCF and 10ng/ml IL3 up to 14 days for erythroid differentiation.
UT7 cells (Komatsu et al., 1991) were cultured in alpha MEM supplemented with 10% FBS and 2U/mL Epo. HEK293, K562, Huh7 and HepG2 were cultured in DMEM containing 10% FBS.

Lentiviral constructs, lentiviral production and cell infection

Lentiviral constructs for control and AMPKα1 shRNAs were described in (Sujobert et al., 2015). To obtained recombinant lentiviruses, 293T cells were transiently transfected by calcium phosphate precipitation with 3 different plasmids: pCMV-G (VSVG envelope coding sequence), pCMV-gag-pol and a recombinant pLKO.1 vector encoding either a control or AMPKα1 shRNA. Supernatants containing infectious lentiviral particles were concentrated by ultracentrifugation. Infections of human erythroblasts were performed at day 1 after CD36 cell sorting and culture in the presence of IL-3, SCF and Epo as described above.

Flow cytometry

Cell labelling was carried out as previously described (Gautier et al., 2016). Briefly, PC7-conjugated GPA, APC-conjugated anti-CD49d (a4 integrin) or appropriated isotype control were purchased from Beckman Coulter and PE-conjugated anti-

BRIC6 (anti-Band3) were from International Group reference laboratory NHS and Transplant. FITC-Conjugated Annexin V was used to measure the percentage of cell apoptosis.

Cell proliferation

Cell proliferation was determined by Uptiblue Viable Cell Counting Kit according to the manufacturer protocol (Uptima, Interchim France) or by Trypan Blue exclusion Dye.

Statistics

Results are expressed as means +/- SD. Student's *t*-test was used for determining statistical significance. P-values of < 0.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

1-AMPK α1 activation is restricted to immature stages during human erythroid differentiation

Because AMPK occurs as heterotrimeric complexes containing catalytic α subunits and regulatory β and γ subunits, we aim at identifying which isoforms are expressed in normal human erythroblasts and at studying their variation during human erythroid differentiation. Human primary erythroid progenitors are maintained up to 14 days in culture, and are able to differentiate from the pro-erythroblast stage (D2) to the reticulocyte stage (D14) (Fig1A). During maturation, the erythroblasts progressively acquired cell surface specific markers such as GPA (from basophilic erythroblasts stage), Band 3 (from basophilic - polychromatophilic erythroblasts stages) and decreasing expression of α4 integrin from the orthochromatic erythroblast stage. They also begin to synthesize hemoglobin from the basophilic stage I (Fig1A). We previously determined by an absolute quantitative proteomics analysis the copy number of individual AMPK proteins for each stage of erythroid differentiation (Gautier et al., 2016). For the catalytic subunit, α1 catalytic subunit is expressed

while the α2 isoform is not detectable. This result was confirmed by Western Blot experiments (Fig1C). The expression of α1 is constant along erythroid differentiation, except for the very last stages of differentiation, where the expression diminishes reflecting the reduction of global protein synthesis constantly observed at the end of human erythroid differentiation (Gautier et al., 2016). For the regulatory subunits, β1 and γ1 are expressed along the erythroid differentiation process, while β2 and γ2 isoforms are not detectable by Mass spectrometry analysis (Fig1B). These results are confirmed by western blotting (Data not shown). Overall our results suggest that the α1/β1/γ1 is the heterotrimeric complex predominantly present in human erythroblasts. Interestingly the absolute quantitative proteomic analysis demonstrated that the expression of the three isoforms globally followed the same profile, but they are not expressed at identical quantity with a 2/1/4 ratio for α1/β1/γ1.

Albeit global constant expression of AMPK, its activation might be modulated during erythroid differentiation. Thus, we investigate AMPK activation by the detection of the α1 catalytic subunit phosphorylation on Thr172 and the phosphorylation of one of its substrate, the ACC (Acetyl CoA Carboxylase) on Ser79 (Fig.1D). From day 4 (d4) to d8, the phosphorylation of AMPK and of ACC was clearly detectable and concomitant. Then, pS79 ACC and pT172 AMPK phosphorylations decreased from d10 to the end of differentiation (Fig1D). These data showed that the activation of AMPK is following two phases: (1) a clear activation in immature erythroblasts from pro-erythroblasts stage to d8 when the cells are $GPA^{med}/Band3^{low}$ (basophilic erythroblasts I), and (2) a reduced activation in mature $GPA^{high}/Band3^{med}$ erythroblasts from d10 to d14, corresponding to polychromatic erythroblasts to reticulocytes.

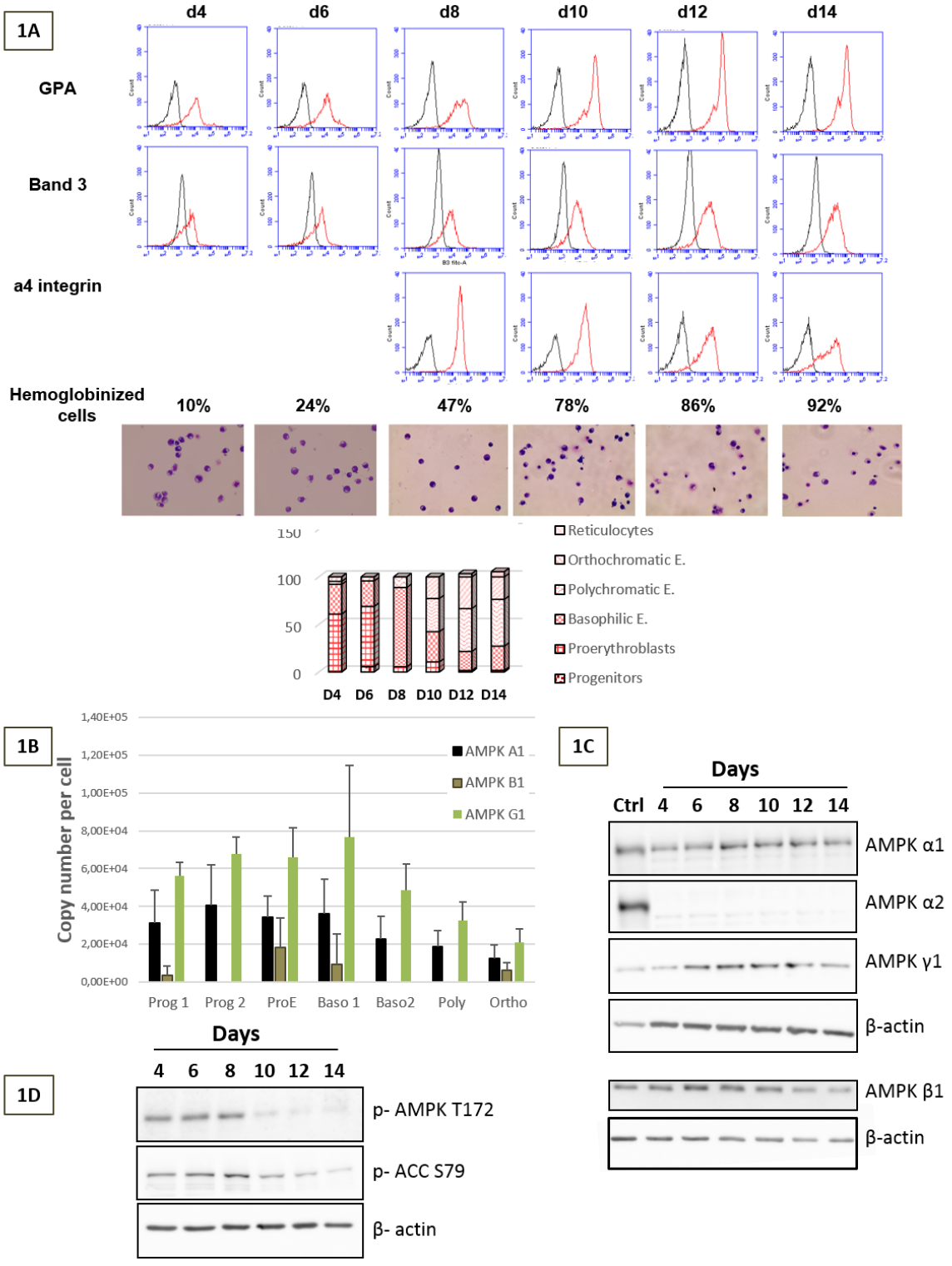


Fig 1: Expression of AMPK isoforms and AMPK activation along terminal erythroid differentiation: **(A)** Representative experiment of *ex vivo* culture of erythroblasts derived from CD34⁺ cells. Cells were analysed at day 4, 6, 8, 10 12 and 14. Morphology analyses were performed using May-Grünwald-Giemsa staining. Expression of cell surface markers GPA, Band3 and α4β1 integrin were studied by flow cytometry along terminal erythroid differentiation. Percentage of hemoglobinized cells were determined by benzidine staining. **(B)** Determination of AMPK Isoforms during erythropoiesis by quantitative proteomic. Copy number of proteins in each differentiation stage has been determined from data extracted

from our work in (Gautier et al., 2016). **(C)** Determination of AMPK Isoforms during erythropoiesis by Western Blot. Protein extracts from human primary erythroblasts from d4 to d14 of culture were analysed using anti-α1, α2, β1, γ1 antibodies. Anti-β-actin was used as a loading control and mouse liver protein extracts were used as a positive control for the expression of AMPK β2 (Ctrl). α1, α2, γ1 were analysed on the same WB, β1 on a distinct one. **(D)** AMPK activation during erythroid differentiation. Anti-P T172 AMPK and anti-P S79 ACC antibodies were used. Fig 1 showed a representative experiment of 4 independent ones.

2-Knockdown of AMPK by shRNA induces a slow-downed proliferation and defects in the differentiation of human erythroblasts.

To decipher the role of AMPK in erythroblasts, we inhibited AMPK expression by a specific shRNA targeting the α1 catalytic subunit. In primary erythroblasts, the decrease in α1 AMPK expression resulted in inhibition of AMPK phosphorylation on Thr 172 and a decrease of the phosphorylation of AMPK substrates ACC and ULK1 as expected (Fig2A). No compensatory mechanism involving the α2 subunit is observed when α1 is targeted (data not shown). The inhibition of AMPK expression did not affect significantly the viability of the cells measured by trypan blue exclusion assay (Fig2B) or by Annexin V flow cytometry analysis (Fig2D, left Panels). ShAMPKα1 erythroblasts harboured a reduced proliferation ability compared to ShControl erythroblasts (Fig 2B). Along erythroid differentiation, erythroblasts are acquiring progressively the GPA and the Band 3 markers, while losing the α4 marker. At d4, both sh control and sh AMPK erythroblasts populations were GPA^{med}, Band 3^{low} and $\alpha4^{high}$. There was no difference between the two types of erythroblasts in cell surface marker expression. At d8, as expected, the control erythroblasts population maturated and are GPA^{High}, Band 3^{med} and $\alpha4^{med}$. However, a reduced number of GPA^{high} erythroblasts is detected in the shAMPK cell population at d8, suggesting a delay in erythroid differentiation, but at the same time we can observed the apparition of an advanced population that is Band 3^{med} $\alpha4^{med}$ in the absence of AMPK. Overall, the decrease in AMPK expression resulted in reduced cell proliferation without affecting cell viability, and in a defect in erythroblasts maturation. Indeed, GPA acquisition is delayed in Sh α1AMPK cells while Band3 acquisition and α4 decrease occur earlier than in the Sh Control cells.

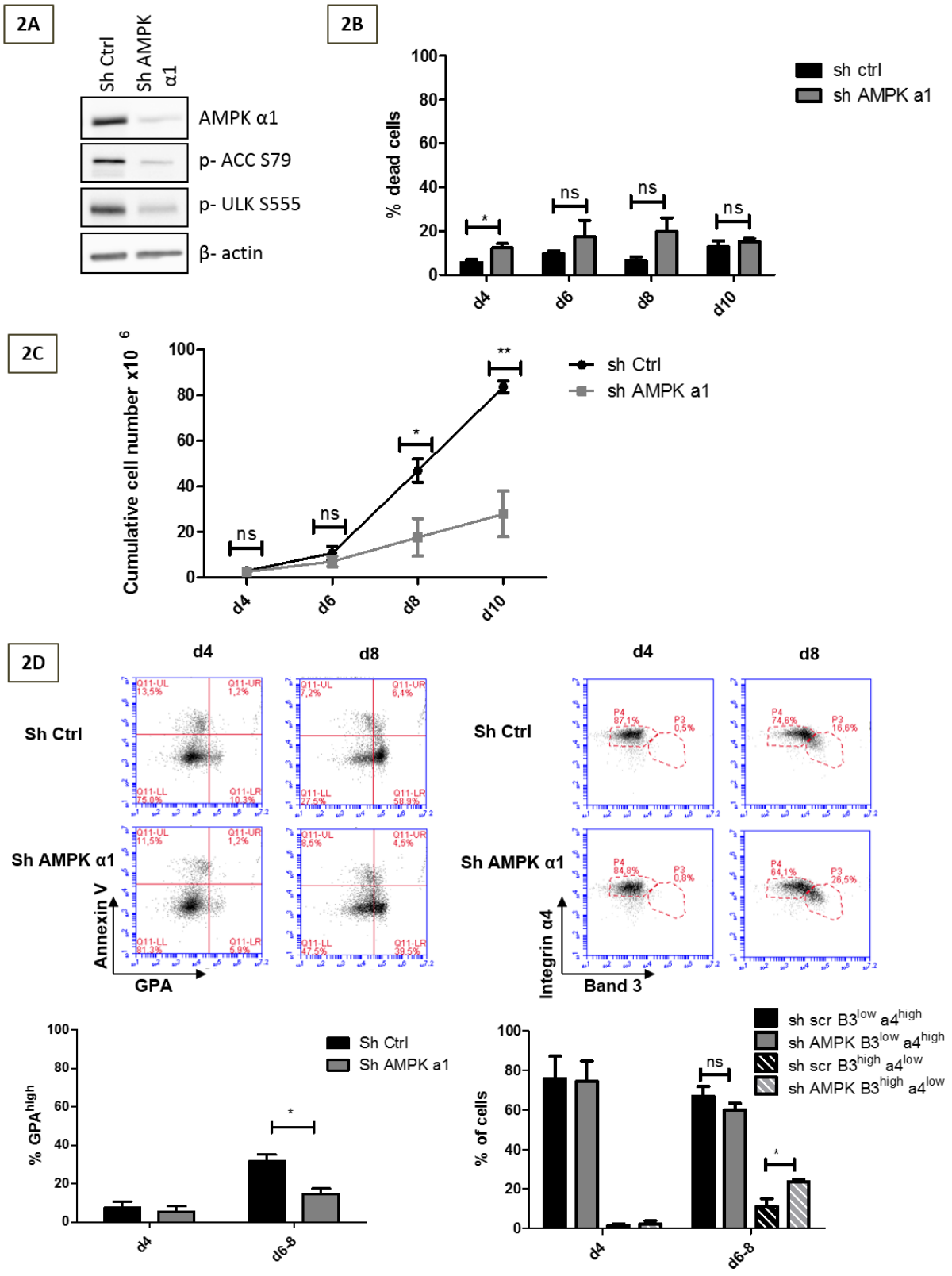


Fig 2 AMPK α1 knockdown reduces erythroblasts proliferation and impacts cell differentiation: **(A)** Efficiency of AMPKα1 knockdown: Erythroblasts were infected at d1 after CD36 cell sorting with a lentivirus coding either for a scramble ShRNA (Sh Ctrl) or an

AMPKα1 Sh RNA (Sh AMPK α1). Efficiency of AMPKα1 knock-down in human primary erythroblasts was determined by anti-α1 AMPK, anti-PS79 ACC and anti-PS555 Ulk1 Western Blots. **(B)** Proportion of dead cells was determined by trypan blue exclusion dye at d4, 6, 8 and 10 of culture. Results are expressed as the mean +-SEM. ns non significative, *p<0.05.n=3 independent experiments. **(C)** Proliferation of shCtrl vs. Sh AMPK a1 erythroblasts. Cumulative cell number was determined by counting cells with trypan blue exclusion method at day 4, d6, d8 and d10 of the culture**. (D)** Representative cytometry profile for GPA /Annexin V (left panel) and Band3/ α4 integrin (right panel). Percentage of GPA^{high} cells and percentage of Band 3^{low} $\alpha4^{high}$ and Band3 ^{high} $\alpha4^{low}$ in the ShCtrl and Sh AMPKα1 cell population (Lower panels). Results are expressed as the mean +-SEM. ns non significative, *p<0.05 n=3 independent experiments.

3- AMPK activation by direct activator GSK621 inhibits proliferation and survival of the UT-7 erythroleukemic cells. .

To further investigate the role of AMPK in erythroid cells, activation of AMPK was enhanced by GSK621, a potent novel direct activator of AMPK, (Sujobert et al., 2015) (Liu et al., 2017) (Jiang et al., 2016) (Chen et al., 2016). In hematopoietic cells, GSK621 has been reported to be more potent in primary AML (Acute Myeloid leukemia) cells and AML cell lines than the direct activator A-769662 (Sujobert et al., 2015). UT-7 cells is an erythroleukemic cell line derived from an AML-7 that express only the α1 catalytic subunit, as in primary erythroid cells, α2 subunit is not expressed (Fig 3B, left panel).

UT7 cell viability was assessed after 3 days of incubation with increasing dose of GSK621 (0-100µM). A GSK621 dose-dependent cell proliferation inhibition was observed and 20 µM of GSK621 abolished cell proliferation (Fig3A). This decrease in proliferation is probably due to cell death since we measured 80% of dead cells and 60% of Annexin V positive cells after 48 h treatment by 20µM GSK621 (Fig3C, dark grey bars). Targeted shRNA knockdown of AMPKα1 in UT-7 cells protected the cells from death (79.7% for sh SCR versus 50% for Sh AMPK α1 cells are trypan blue positive and 60% for sh SCR versus 42 % for ShAMPK are Annexin V %)**.** This last result demonstrated the specificity of 20 µM of GSK621 for AMPK.

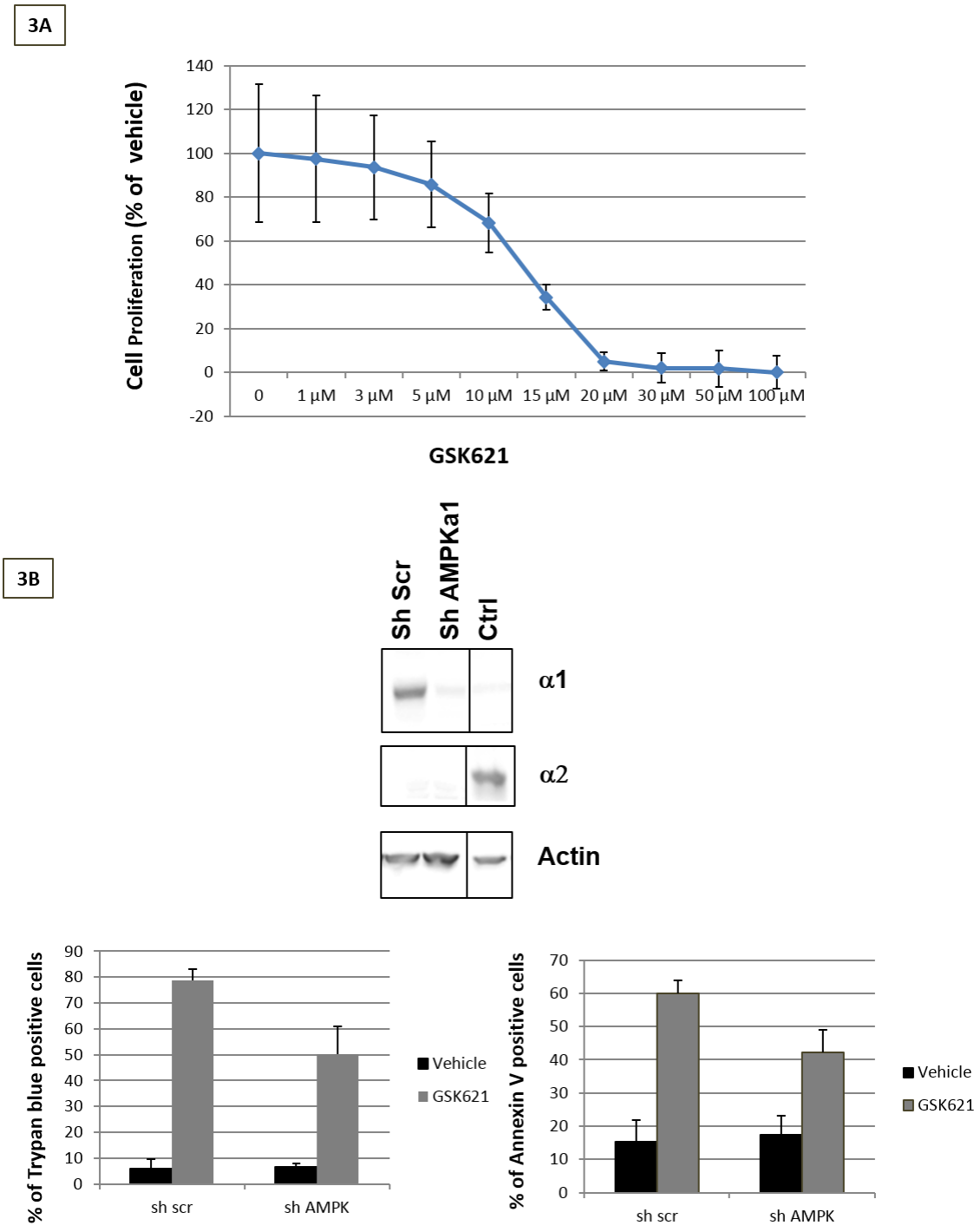


Fig 3: Inhibition of proliferation and survival in UT-7 Epo cells by GSK621-mediated AMPK activation. (A) Sensitivity of UT-7 cells to GSK621. UT-7 cells were incubated for 72 h with the indicated concentration of GSK621. Cell proliferation was quantified by Uptiblue, a fluorescent analogue of MTT. **(B)** Specificity of GSK621 for AMPK. Erythroblasts were infected at d1 after CD36 cell sorting with a lentivirus coding either a scramble ShRNA (Sh Ctrl) or an AMPKα1 Sh RNA (Sh AMPKα1). Efficiency of AMPKα1 knock-down in human UT-7 cells was determined by anti-α1 AMPK western blot. Anti-α2 AMPK antibody was used to insure no re-expression of this isoform was triggered upon α1 knockdown. β-actin is used

as a loading control. Proportion of dead cells was determined by trypan blue exclusion dye assay in UT7 single-cell cloned shCtrl or shAMPKα1. Proportion of Annexin V positive cells were determined by flow cytometry analysis, n=3 independent experiments.

4- Proliferation and survival of mature GPA ^{High} erythroblasts are specifically and drastically diminished by GSK621 mediated -AMPK activation.

In primary erythroblasts, the activation of AMPK by GSK621 is dose-dependent. The compound increases phosphorylation at AMPKα T172 and also gradually stimulated from 5 to 20 µM the phosphorylation of AMPK's substrates: ACC on Ser79 and ULK1 on Ser 555 (Fig 4A). This latter dose was used in the experiments.

GSK621 has been added to the medium from d0 after CD36 cell sorting until the indicated days. GSK621 dramatically reduced the proliferation rate of the cells with a more drastic effect on the most mature erythroblasts (Fig4B). GSK621 induced 32 % of cell death at d5-7 and 70 % at d8-9 (Fig4C).

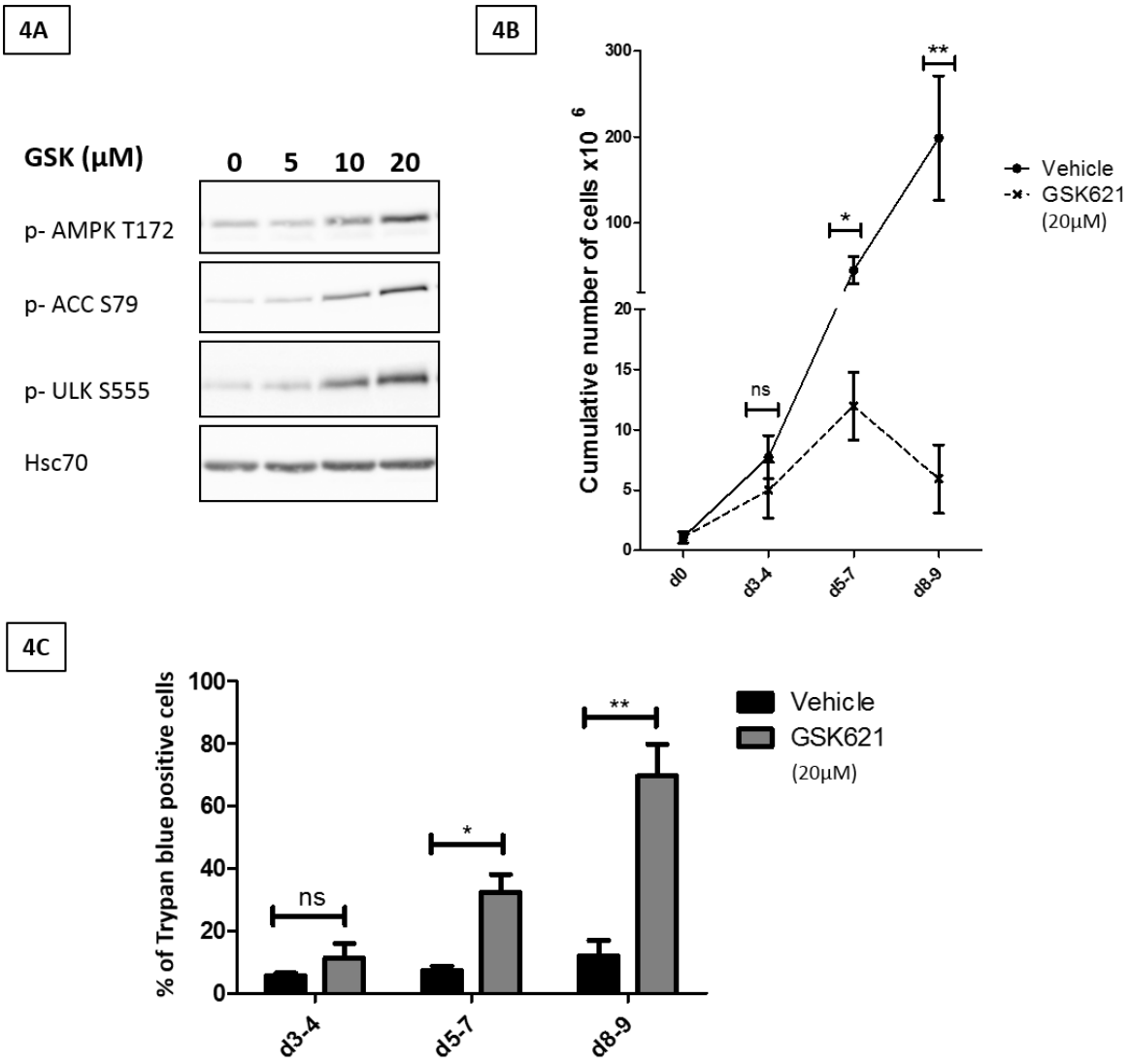


Fig 4: ***GSK621 mediated -AMPK activation specifically and drastically decreases proliferation and survival of mature GPA ^{High} erythroblasts*** **(A)** GSK621 dose-dependent activation of AMPK in erythroblasts. Western Blot analysis of P T172 AMPKa1, P S79 ACC and P S555 Ulk1 in primary erythroblasts incubated 3 h with increasing dose of GSK621. Anti-Hsc70 was used as a loading control. **(B)** Inhibition of erythroblasts proliferation by GSK621. Erythroid cells have been incubated in the absence (vehicle) or presence of 20µM GSK621 from d0. Cumulative cells number was determined by counting cells with the trypan blue exclusion method at day 0, d3-4, d 5-7 and d8-9 from 3 independent cultures. The three independent experiments days of culture were matched upon differentiation stages for the vehicle. **(C)** GSK621 induces massive cell death from d5-7.

To gain further insight into the inhibition of mature erythroblasts proliferation by GSK621, the cell cycle was analysed by quantitation of DNA content with Propidium

Iodide. At d9, GSK921 induces a reduction of the number of cells in G2/M and an increase of cells in the early S phase (Fig 4D, upper panels)

The protein level of AMPK substrates involved in cell cycle were determined: P53 (Jones et al., 2005), P27 (Liang et al., 2007) and P21 which is one of P53's target genes. The expression pattern of several components of the cell cycle controlling the progression in S and G2/M phase was analysed like Cyclin A2, a master regulator of progression through the S phase (Yam et al., 2002) and cyclin B1. In addition, transcription of Cyclin A2 has been shown to be under the control of AMPK (Merlen et al., 2014). GSK621 –mediated cell cycle arrest was not due to the phosphorylation and consequent stabilization of P53, since there were no variation in their expression. By contrast, a highly sustained level of cyclin A2 and Cyclin B1 was observed and may account for the defects in cell cycle progression (Fig 4D, lower panels).

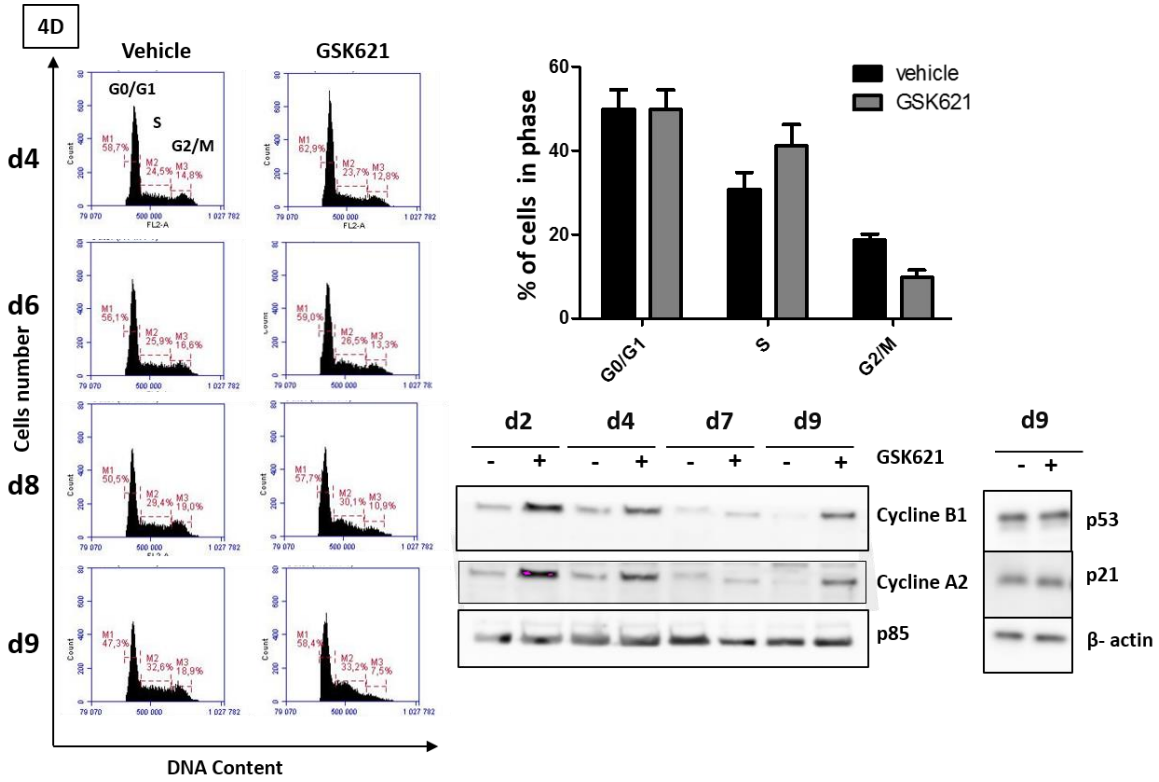
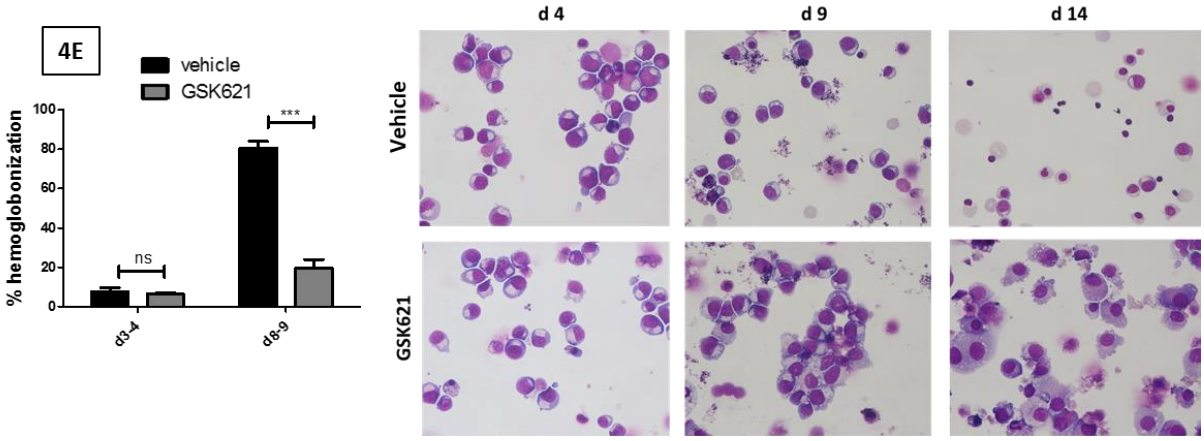
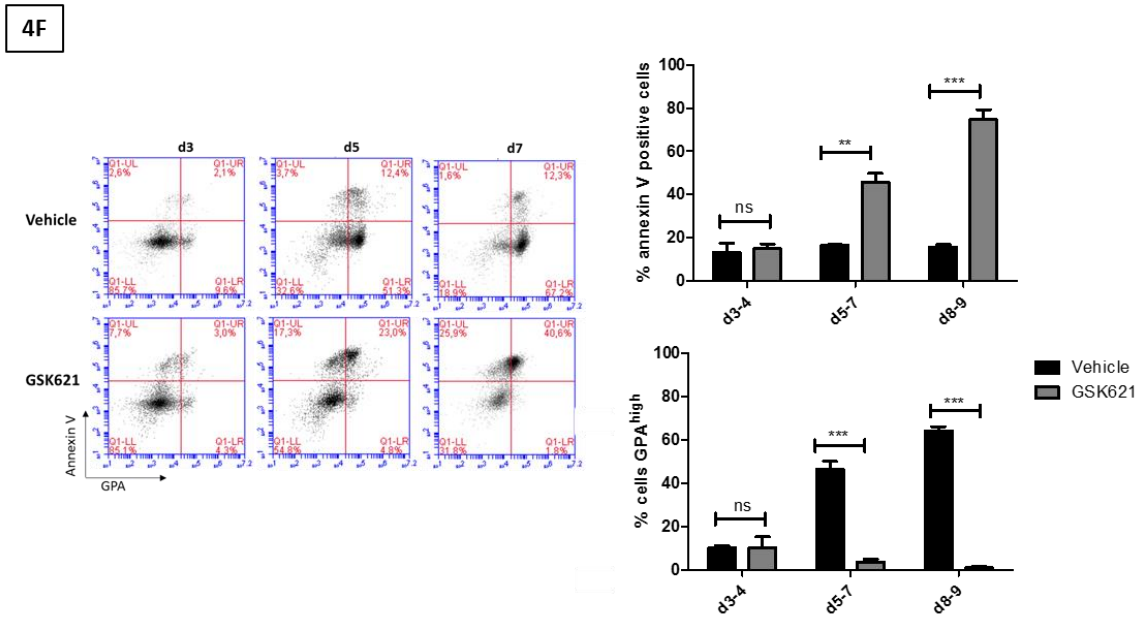


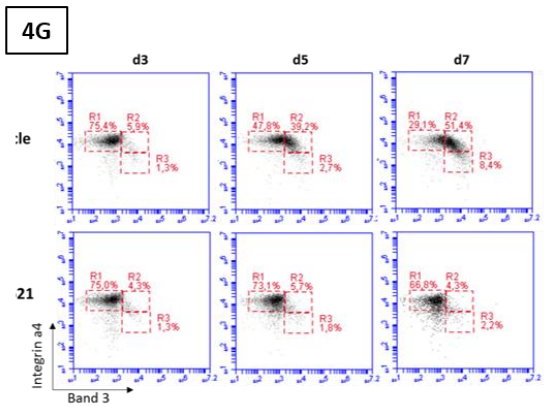
Fig 4: (D) GSK621 induces an accumulation of cells in S phase. Erythroid cells have been incubated in the absence (vehicle) or presence of 20µM GSK621 from d0 to the indicated day Propidium Iodide incorporation assay has been performed. A representative experiment is shown; 4 independent experiments were performed and results expressed as the mean +- SEM. ns non significative, *p<0.05. Expression of proteins regulating the cell cycle. Cyclin A2, cyclin B1, P53, P21 have been detected by WB experiments using specific antibodies. P85 from PI3K is used as a loading control.

We then studied in more details whether GSK621-mediated AMPK activation could affect the erythroblasts differentiation. In this set of experiments, at d3-4 cells are immature, they don't synthesise hemoglobin yet. At d8-9, more than 80 % of the cells are hemoglobinized (Fig4E, upper panel). In the presence of GSK621, at d8-9, the percentage of cells that synthesize hemoglobin is very low suggesting a possible arrest in differentiation. Furthermore, morphological studies after May-Grünwald-Giemsa coloration confirm the block in maturation. Indeed, in vehicle-treated cultures, at d9 the population is mainly constituted of polychromatophilic erythroblasts and at d14 orthochromatic erythroblasts and reticulocytes. Yet, in GSK621-treated culture, at d9 and d14, cells are very immature with big nucleus and uncondensed chromatin, no mature cells are detected at d14.

To decipher more precisely the stage at which the GSK621–mediated activation of AMPK induces cell death, erythroblasts were analysed for GPA and Annexin V by flow cytometry (Fig4F). GSK621 did not affect immature GPA^{med} cells at day 3-4, but induced a massive cell death of GPA^{high} erythroblasts at day 5-7 (46% annexin V positive cells with GSK621 vs 16% in control cells) and at day 8-9 (75% vs 16%). GSK621 induced the death of erythroblasts at the Basophilic stage. Indeed, after AMPK activation at day 5-7, only 3.5% of erythroblasts are GPA^{high} in contrast to 46.4% in control cells. Furthermore, only 7.5 % of GSK621-treated cells are $Band3^{high}$ compared to 42% in control cells (Fig4G). At days 8-9, in control condition, erythroid cells continue to differentiate in contrast to immature GSK621-treated cells. Same results (decreased proliferation and survival, differentiation blockage) have been obtained with another direct activator of AMPK, the 991 (Fig S1 A, B).







(E) GSK621-dependent AMPK activation reduces the percentage of hemoglobinized cells. The percentage of hemoglobinized cells were determined by benzidine staining after incubation in the absence (vehicle) or presence of 20µM GSK621 from d0 to the indicated day. Morphology analysis were performed by May-Grünwald-Giemsa coloration, a representative experiment is shown at d4, d9 and d14. **(F)** GSK621-mediated AMPK activation blocked erythroblasts differentiation. Erythroblasts have been incubated in the absence (vehicle) or presence of 20µM GSK621 from d0 to the indicated days.

Representative cytometry profiles for GPA /Annexin V (upper panel) and percentage of GPA^{high} cells and percentage of Annexin V positive cells (Lower panels) are shown. Results are expressed as the mean +-SEM. ns non significative, *p<0.05 n=3 independent experiments. **(G)** Cell surface expression of Band3 and α4 integrin in the presence of GSK621. Representative cytometry profiles for Band3/ α4 integrin are shown.

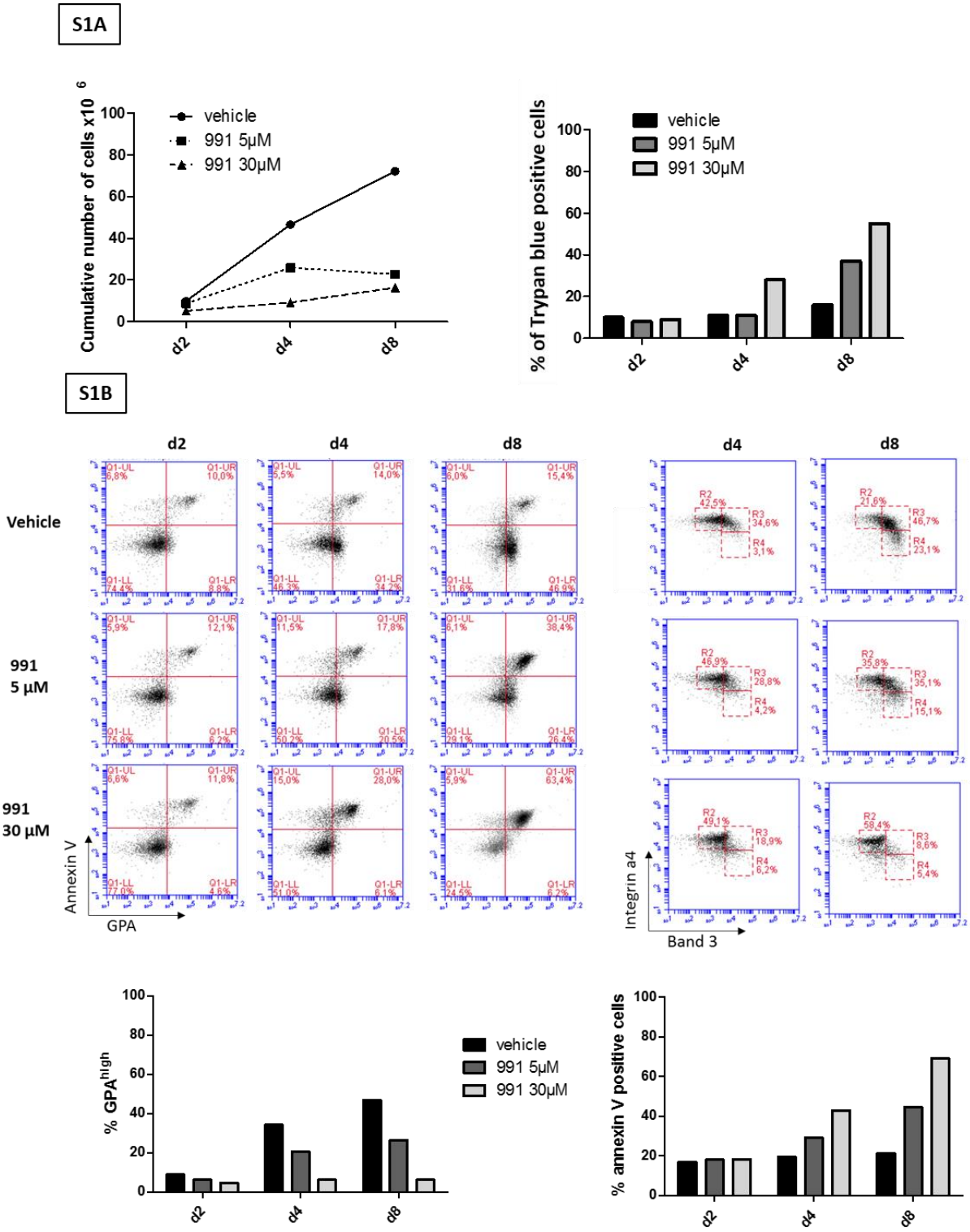


Fig S1: 991-mediated AMPK activation leads to apoptosis of mature GPAHigh erythroblasts. **(A)** Inhibition of cell proliferation and increased cell death in the presence of 991**.** Erythroid cells have been incubated in the absence (vehicle) or presence of 5 or 30µM

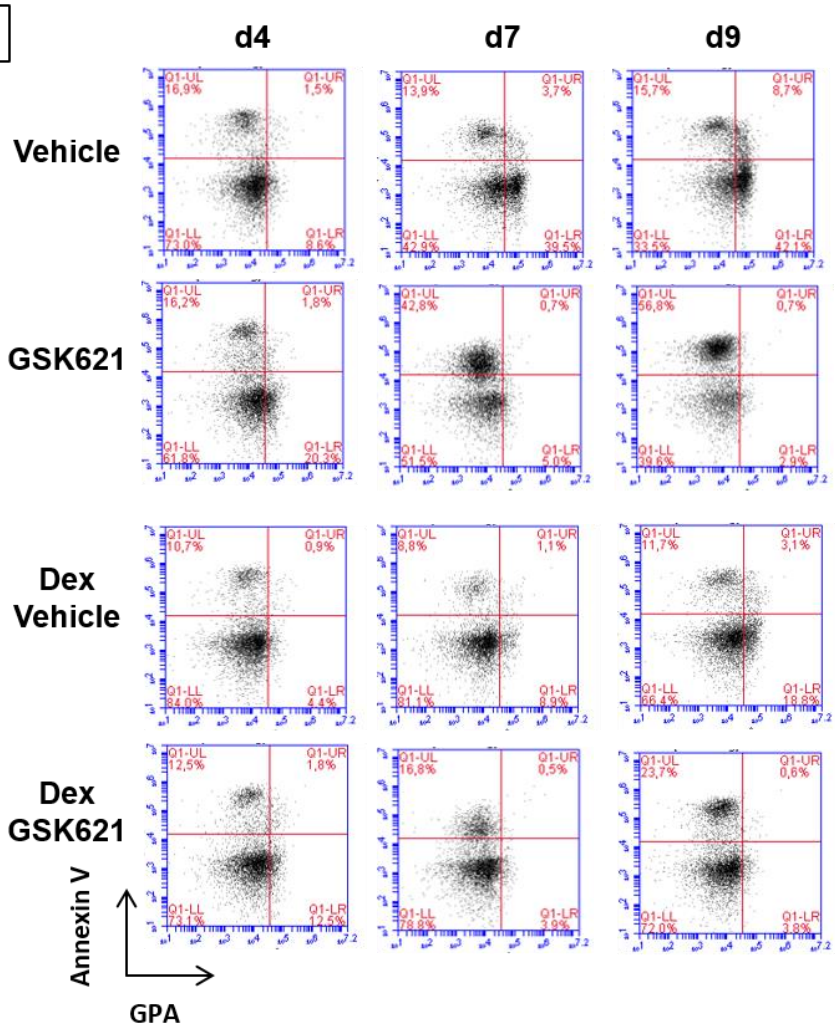
991 from d0 to the indicated days of culture. Cumulative cells number (left panel) and proportion of dead cells (right panel) were determined by counting cells with trypan blue exclusion method. **(B)** Expression of cell surface markers and Annexin V in the presence of 991. Cells were labelled with anti-GPA and for Annexin V binding and Band3/ α4 integrin, then analysed by flow cytometry. A representative experiment and histogram with the percentage of GPA^{high} and Annexin V positive cells are shown.

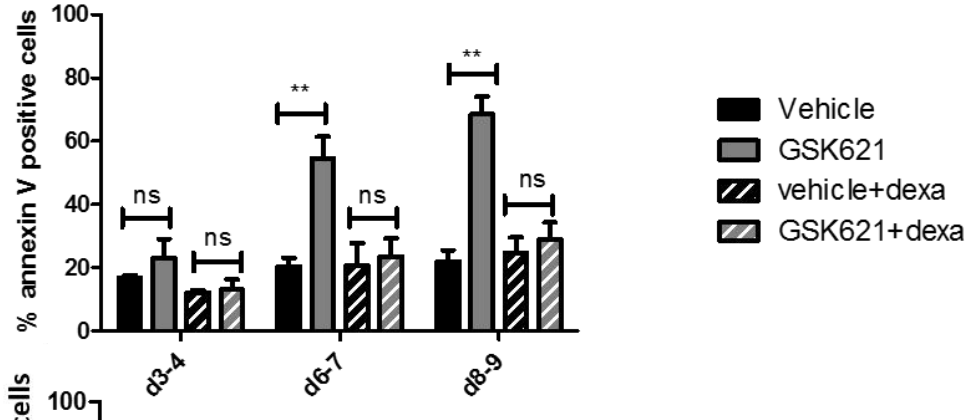
To reinforced our data, we take advantage of the fact that erythroid progenitors and early precursors can proliferate without differentiating in response to Epo, SCF and dexamethasone (Dex) (von Lindern et al., 1999). We maintained the cells for the indicated numbers of days in culture medium with vehicle, GSK621, Dex or Dex +GSK621 (Fig 5A). As expected, the presence of Dex inhibited erythroid differentiation as demonstrated by the absence of GPA^{high} population after 7 days, and even 9 days of culture. After d7 or d9, GSK621 alone induced cell death as previously described (Fig.4C, 4F) but GSK621+Dex treated-immature erythroblasts are resistant to GSK621-induced cell death (Fig5 A, B)

To confirm that activation of AMPK in mature erythroblasts provoked cell death, GSK621 was added for 24 and 48h at d9 when the erythroblastic population contained already 35% of mature GPA^{High} cells (Fig5C). The GPA/Annexin V staining clearly demonstrated that GSK621 induced a massive cell death of mature GPA^{High} within less than 48 h. With GSK621, 52% of the total cells are positive for Annexin V and 43% are stained by trypan Blue versus 16% and 10% respectively for the control.

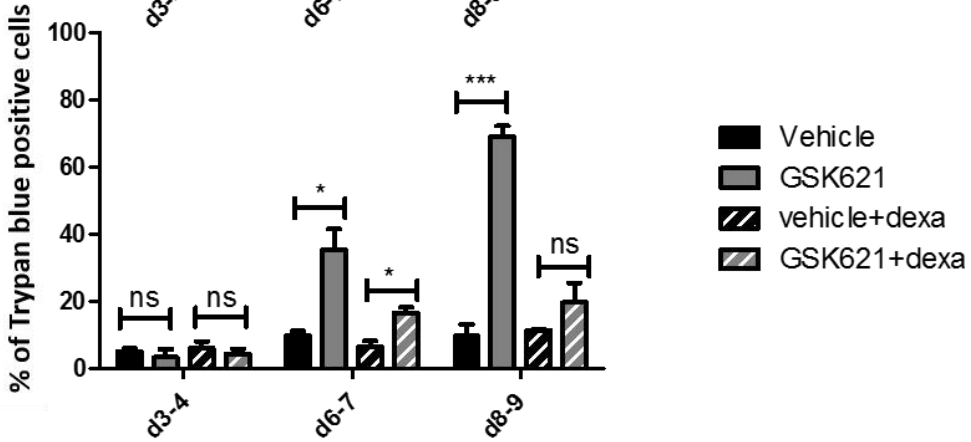
Overall our results demonstrate that the effect of the activation of AMPK targets mature GPA^{High} cells specifically, whereas immature erythroblasts from the progenitor stage to the proerythroblast stage are not affected.

5A


d4
d7
d9
Vehicle
GSK621
Dex Vehicle
Dex GSK621
Annexin V
GPA


% annexin V positive cells
100
80
60
40
20
0
ns
ns
**
ns
**
ns
d3-4
d6-7
d8-9
Vehicle
GSK621
vehicle+dexa
GSK621+dexa

5B


% of Trypan blue positive cells
100
80
60
40
20
0
ns
ns
*
*
***
ns
d3-4
d6-7
d8-9
Vehicle
GSK621
vehicle+dexa
GSK621+dexa

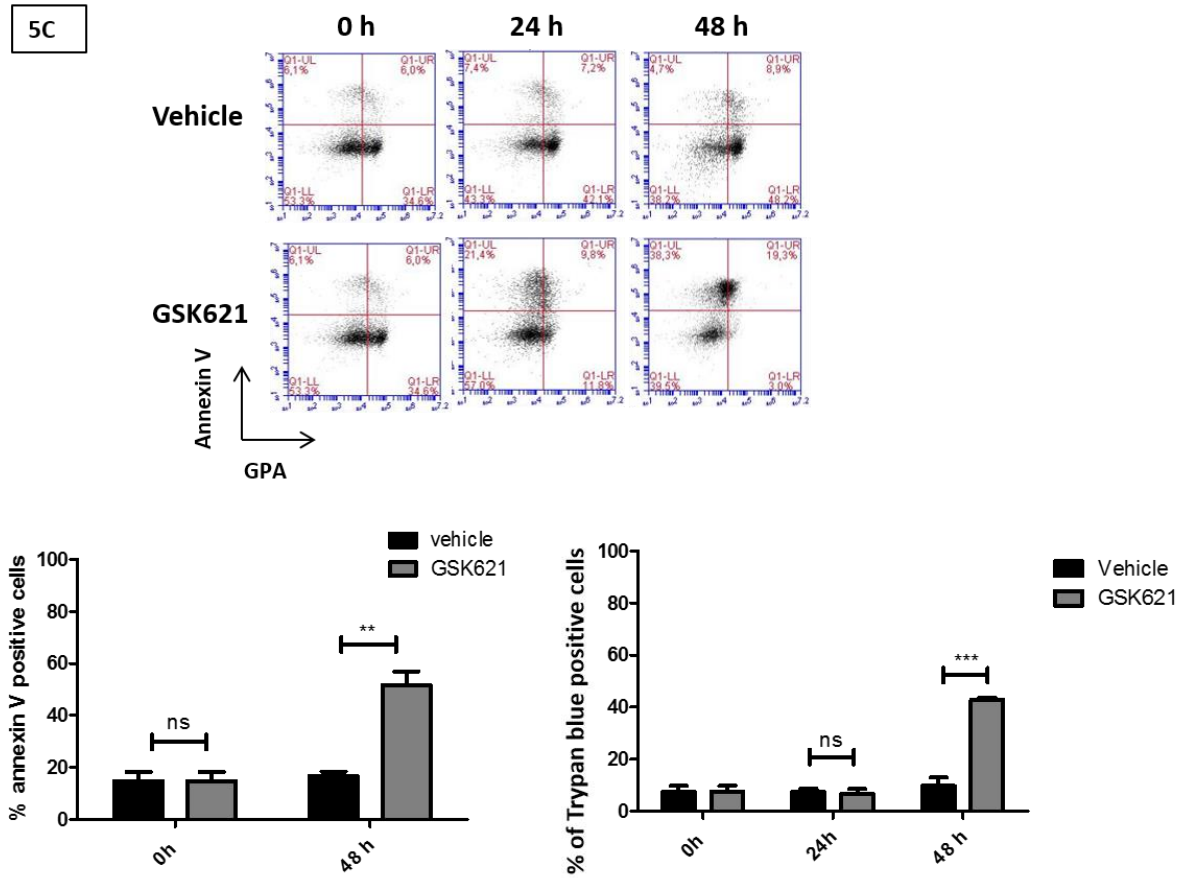


Fig 5: AMPK activation by GSK621 provokes cell death of mature GPA^{High} Erythroblasts. (A) GSK621 does not increase the percentage of Annexin V positive cells in an immature cell population. Erythroid cells have been incubated in the absence (vehicle) or presence of 20µM GSK621 and $2*10^{-7}$ M Dexamethasone (Dex)/Vehicle or Dex/GSK621 from d0 to the indicated day. Cells were labelled with anti-GPA and for Annexin V binding and analysed by flow cytometry. A representative experiment and percentage of Annexin V positive cells from n=3 are shown. **(B)** GSK621 does not induce cell death when the population of erythroblasts is immature. Proportion of dead cells was determined by trypan blue exclusion dye assay. **(C)** GSK621-mediated AMPK activation specifically induces cell death of mature GPA ^{High} erythroblasts**.** *Mature* GPA^{high} erythroblasts have been incubated in the absence (vehicle) or presence of 20µM for 24 or 48 h; Cells were labelled with anti-GPA and for Annexin V binding and analysed by flow cytometry (Upper Right panel). A representative experiment and percentage of Annexin V positive cells from n=3 are shown (lower panel). Proportion of dead cells was determined by trypan blue exclusion dye assay (Right Panel). Results are expressed as the mean +-SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***<0.001.

5- AMPK activation induced autophagy and apoptotic cell death in mature erythroblasts

As shown previously, AMPK activation in erythroblasts leads to ULK1 phosphorylation on S555 (Fig4A). ULK1 is well known to be important for autophagy induction in several cell types (Kim et al., 2011). In GSK621-treated erythroblasts,

LC3B-II accumulation is clearly detected by immunoblot (Fig 6A, left panel). Autophagy induction was confirmed by the use of Chloroquine which blocks the degradation of autophagosomes, Indeed, in addition to GSK621, Chloroquine treatment further increased LC3B-II and p62 showing that activation of AMPK by GSK621 in mature erythroblasts induced autophagy (Fig6A, right panel).

Then, we wondered whether GSK provoked a caspase-dependent apoptotic cell death and incubated cells with a pan caspase inhibitor Q-VD-OPh (QVD) in addition to GSK621. When caspase activity is blocked by QVD (as demonstrated by the anti-cleaved-caspase 3 immunoblot, Fig 6B), mature erythroblasts are protected from GSK621-induced cell death showing that AMPK activation induced a caspase-dependent apoptotic cell death.

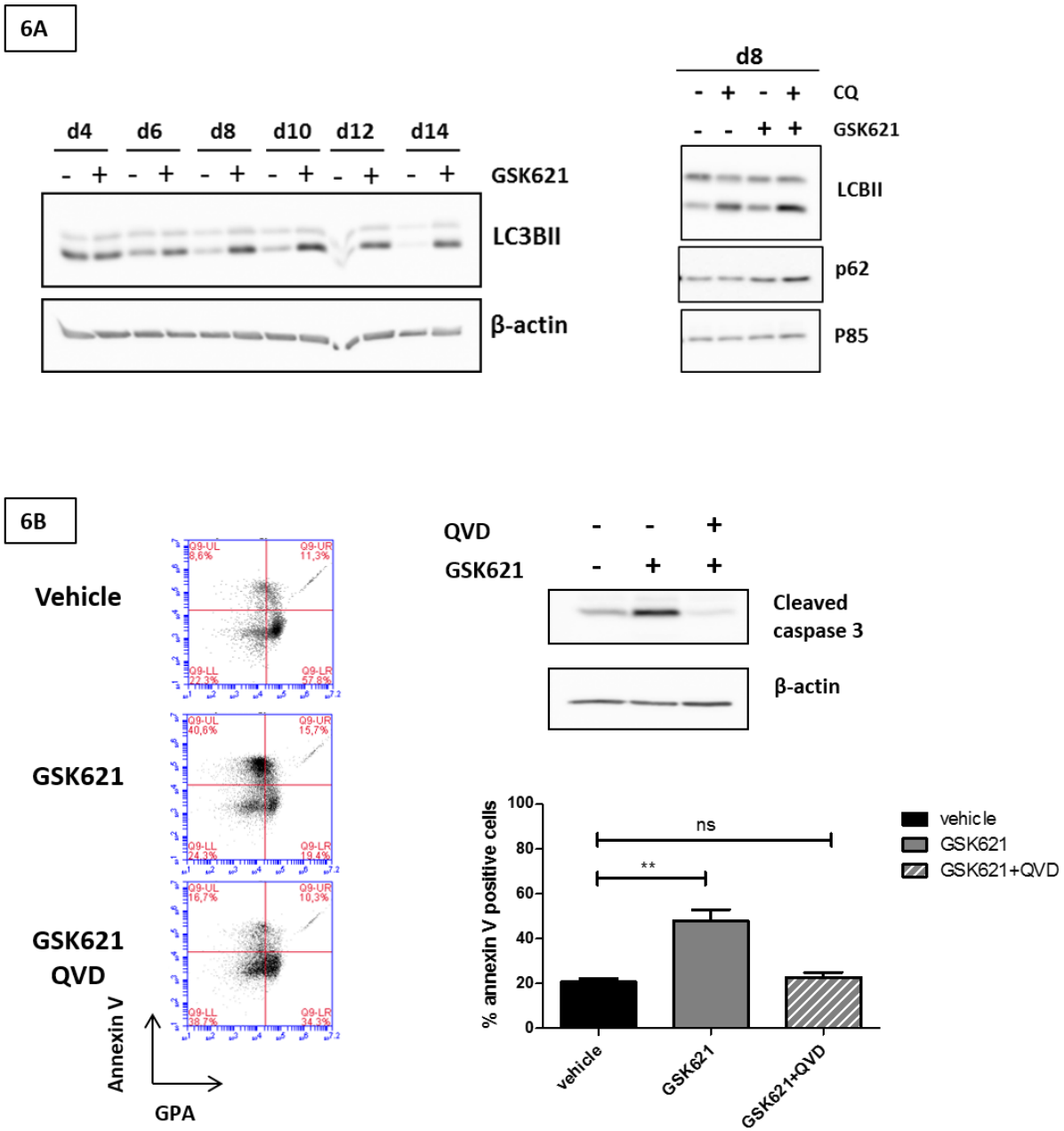


Fig 6: GSK621 mediated AMPK activation leads to autophagy and apoptosis (A) GSK621-mediated AMPK activation induces autophagy. Erythroblasts have been incubated in the absence (vehicle) or presence 20µM GSK621 from d0 to the indicated days of culture (left panel). 10µM chloroquine (CQ) was added for 4 h before harvesting cells (right panel). LC3BII and p62 has been detected by WB experiments using specific antibodies. Anti-β actin or p85-PI3K were used as a loading controls. **(B)** GSK621 provokes apoptosis of mature GPA^{High} erythroblasts. Mature GPA^{high} erythroblasts have been incubated in the absence (vehicle) or presence of 20µM GSK621 or 20µM GSK621 and 10µM QVD for 48 h; Cells were labelled with anti-GPA and for Annexin V binding and analysed by flowcytometry. A representative experiment and percentage of Annexin V positive cells from n=3 are shown. Results are expressed as the mean +-SEM. *p<0.05, **p<0.01. Efficiency of QVD to block caspase activity was determined by WB using an anti-caspase 3 antibody that specifically detect the cleaved isoform of caspase 3. β-actin is used as a loading control.

DISCUSSION

We previously showed that *Ampk α1*$^{-/-}$ and *Ampk γ1*$^{-/-}$ mice present a hemolytic anemia, and their RBCs show elasticity defects in their plasma membrane. As membrane elasticity is progressively acquired during RBCs maturation, the defect due to *Ampk* knockout is most likely initiated during erythropoiesis. Therefore, we aim to study the role of AMPK during human erythropoiesis.

As in red blood cells, α1 is the only expressed catalytic subunit in erythroblasts, α2 is not detected and we showed that the heterotrimer α1/β1/γ1 is predominant from erythroid progenitors to acidophilic erythroblasts and slightly decreased at the very late stages.

During the earliest stages of terminal differentiation, from progenitors to the Basophilic stage, AMPK is activated and then its activation is drastically reduced from the Basophilic to the reticulocytes stage. AMPK is activated by phosphorylation at T172 by three upstream kinases Lkb1 which seems to be constitutively active, Camkk2 which is activated by a rise in cytosolic Ca++ and possibly Tak1 which is activated by cytokines. Quantitative Mass spectrometry analysis (Gautier et al., 2016) did not allow us to quantify these 3 kinases either due to their absence, either due to their very weak expression or due to the scarcity of peptides generated. Thus, further studies are needed to understand the kinetics of AMPK activation along erythroid terminal differentiation.

In human erythroblasts, our data show that the knockdown of the α1 subunit expression by shRNA induces a slowing down of cell proliferation and does not inhibit cell survival. Somehow, absence of α1 subunit induces an anomaly of the erythropoiesis process, indicated by the shift in pattern of cell surface markers expression during differentiation.

Several recent studies have demonstrated the interest and the specificity to use GSK621 to activate AMPK (Liu et al., 2017) (Jiang et al., 2016) (Chen et al., 2016) (Sujobert et al., 2015). In human erythroid cells, we demonstrated its specificity by the fact that UT7 cells knockdown by an AMPKα1 shRNA are partially resistant to GSK621-induced cell death. The partial rescue may be due to the fact that although undetectable by Western Blots, few molecules of α1 subunits may remain and be

sufficient to be activated by GSK621. Furthermore, the fact that GSK621 induces the apoptosis only in mature erythroblasts and does not affect immature erythroblasts reinforced the specificity of this compound.

In the present study, we demonstrated that AMPK activation in mature (GPA^{high}) erythroblasts (Basophilic to reticulocytes) through the use of direct activators (GSK621 and 991) induces apoptotic cell death whereas no such effect is observed in similarly-treated immature erythroblasts. We propose that maintaining AMPK activation after the basophilic stage when normally AMPK is not activated induces a cell cycle arrest followed by the induction of autophagy and of caspase-dependent apoptosis. Thus, our work suggests that AMPK activation during the final stages of erythropoiesis is detrimental. As the use of direct AMPK activators is being considered as therapeutic treatment in several pathologies (diabetes, AML), this observation is pivotal.

The present work highlighted the role of AMPK in erythropoiesis and is further added to the involvement of AMPK in the regulation of hematopoiesis. Previous elegant works demonstrated that AMPK is particularly important in normal hematopoietic stem cell homeostasis (Gurumurthy et al., 2010) (Gan et al., 2010) (Nakada et al., 2010). Regarding the progenitor/precursors compartment, Obba et al. demonstrated recently that activation of AMPK is crucial for the CSF-1-induced autophagy and human monocyte differentiation into macrophages. In Acute Myeloid Leukemia, sujobert et al. showed that co-activation of AMPK and mTORC1 induces cytotoxicity and that AMPK activation may be a therapeutic opportunity in AML.

Deciphering the molecular mechanisms regulating proliferation, survival and differentiation of erythroblasts is necessary to better understand how erythroid progenitors and precursors can physiologically give birth to red blood cells. Our results demonstrate the importance of finely-tuned regulation of AMPK during adult human erythropoiesis.

REFERENCES

Chen, L., Chen, Q., Deng, G., Kuang, S., Lian, J., Wang, M., and Zhu, H. (2016). AMPK activation by GSK621 inhibits human melanoma cells in vitro and in vivo. Biochem. Biophys. Res. Commun. *480*, 515–521.

Forejtnikovà, H., Vieillevoye, M., Zermati, Y., Lambert, M., Pellegrino, R.M., Guihard, S., Gaudry, M., Camaschella, C., Lacombe, C., Roetto, A., et al. (2010). Transferrin receptor 2 is a component of the erythropoietin receptor complex and is required for efficient erythropoiesis. Blood *116*, 5357–5367.

Foretz, M., Guihard, S., Leclerc, J., Fauveau, V., Couty, J.-P., Andris, F., Gaudry, M., Andreelli, F., Vaulont, S., and Viollet, B. (2010). Maintenance of red blood cell integrity by AMP-activated protein kinase α1 catalytic subunit. FEBS Lett. *584*, 3667–3671.

Foretz, M., Hébrard, S., Guihard, S., Leclerc, J., Do Cruzeiro, M., Hamard, G., Niedergang, F., Gaudry, M., and Viollet, B. (2011). The AMPKγ1 subunit plays an essential role in erythrocyte membrane elasticity, and its genetic inactivation induces splenomegaly and anemia. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *25*, 337–347.

Gan, B., Hu, J., Jiang, S., Liu, Y., Sahin, E., Zhuang, L., Fletcher-Sananikone, E., Colla, S., Wang, Y.A., Chin, L., et al. (2010). Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. Nature *468*, 701–704.

Gautier, E.F., Ducamp, S., Leduc, M., Salnot, V., Guillonneau, F., Dussiot, M., Hale, J., Giarratana, M.C., Raimbault, A., Douay, L., et al. (2016). Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis. Cell Rep. *16*, 1470–1484.

Gurumurthy, S., Xie, S.Z., Alagesan, B., Kim, J., Yusuf, R.Z., Saez, B., Tzatsos, A., Ozsolak, F., Milos, P., Ferrari, F., et al. (2010). The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. Nature *468*, 659–663.

Hardie, D.G. (2011). AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. Genes Dev. *25*, 1895–1908.

Jiang, H., Liu, W., Zhan, S.-K., Pan, Y.-X., Bian, L.-G., Sun, B., Sun, Q.-F., and Pan, S.-J. (2016). GSK621 Targets Glioma Cells via Activating AMP-Activated Protein Kinase Signalings. PLOS ONE *11*, e0161017.

Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J., and Thompson, C.B. (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. Mol. Cell *18*, 283–293.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. Nat. Cell Biol. *13*, 132–141.

Komatsu, N., Nakauchi, H., Miwa, A., Ishihara, T., Eguchi, M., Moroi, M., Okada, M., Sato, Y., Wada, H., and Yawata, Y. (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*, 341–348.

Liang, J., Shao, S.H., Xu, Z.-X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., Kondo, S., Dumont, D.J., Gutterman, J.U., Walker, C.L., et al. (2007). The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. Nat. Cell Biol. *9*, 218–224.

von Lindern, M., Zauner, W., Mellitzer, G., Steinlein, P., Fritsch, G., Huber, K., Löwenberg, B., and Beug, H. (1999). The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro. Blood *94*, 550–559.

Liu, W., Mao, L., Ji, F., Chen, F., Hao, Y., Liu, G., Liu, W., Mao, L., Ji, F., Chen, F., et al. (2017). Targeted activation of AMPK by GSK621 ameliorates H 2 O 2 -induced damages in osteoblasts. Oncotarget *8*, 10543–10552.

Merlen, G., Gentric, G., Celton-Morizur, S., Foretz, M., Guidotti, J.-E., Fauveau, V., Leclerc, J., Viollet, B., and Desdouets, C. (2014). AMPKα1 controls hepatocyte proliferation independently of energy balance by regulating Cyclin A2 expression. J. Hepatol. *60*, 152–159.

Nakada, D., Saunders, T.L., and Morrison, S.J. (2010). Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. Nature *468*, 653–658.

Steinberg, G.R., and Kemp, B.E. (2009). AMPK in Health and Disease. Physiol. Rev. *89*, 1025–1078.

Sujobert, P., Poulain, L., Paubelle, E., Zylbersztejn, F., Grenier, A., Lambert, M., Townsend, E.C., Brusq, J.-M., Nicodeme, E., Decrooqc, J., et al. (2015). Co-activation of AMPK and mTORC1 Induces Cytotoxicity in Acute Myeloid Leukemia. Cell Rep. *11*, 1446–1457.

Wang, S., Dale, G.L., Song, P., Viollet, B., and Zou, M.-H. (2010). AMPKalpha1 deletion shortens erythrocyte life span in mice: role of oxidative stress. J. Biol. Chem. *285*, 19976–19985.

Williams, T., and Brenman, J.E. (2008). LKB1 and AMPK in cell polarity and division. Trends Cell Biol. *18*, 193–198.

Yam, C.H., Fung, T.K., and Poon, R.Y.C. (2002). Cyclin A in cell cycle control and cancer. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *59*, 1317–1326.

XII. Conclusion, discussion et perspectives (partie II)

Effet de l'absence de l'AMPK sur la différenciation érythroïde humaine

Afin de déterminer le rôle de l'AMPK au cours de l'érythropoïèse humaine, nous avons étudié dans un premier temps l'effet de l'absence de l'AMPK dans les érythroblastes primaires grâce à un shARN dirigé contre AMPKα1. Nous avons ainsi montré que l'absence de l'AMPK induit un ralentissement de la prolifération et une anomalie de la différenciation érythroïde. Cette dernière se traduit par **1/** un retard dans l'expression de la GPA et **2/** une accélération de l'acquisition de Band3 et de la perte de l'intégrine α4.

Ces deux évènements sont contradictoires. En effet, un retard d'expression de la GPA semblerait indiquer un ralentissement de la différenciation, tandis que l'accélération de l'acquisition de Band3 et de la disparition de l'intégrine α4 indiquerait plutôt une accélération de la différenciation. A ma connaissance, ce type d'évènement n'a jamais été observé. Au contraire, dans la littérature, une interaction entre la GPA et la Band3 est décrite comme nécessaire à l'adressage de Band 3 du réticulum endoplasmique à la membrane des érythrocytes (Auffray et al., 2001). On s'attendrait donc à un effet similaire du shARN AMPKa1 sur l'expression de ces deux protéines.

Concernant l'effet observé sur la Band3, on pourrait penser à une action directe de l'AMPK. Ainsi, en conditions physiologiques, l'AMPK phosphorylerait Band3 et inhiberait son expression dans les érythroblastes immatures humains. En effet, il a été décrit que Band 3 est un substrat connu des Ser/Thr kinases (Wang et al., 1997) (Pantaleo et al., 2010). De plus, une étude de phospho-protéomique basée sur des tests kinases *in vitro* a démontré que Band 3 pourrait être un substrat direct de l'AMPK dans les globules rouges murins (Thali et al., 2010), ce résultat restant à confirmer dans un contexte cellulaire.

Le sh ARN utilisé ne nous permet pas de maintenir une inhibition de l'expression de l'AMPK jusqu'à la fin de la différenciation. En effet, après 8 jours de culture, une réexpression de l'AMPK est observée et la différenciation érythroïde est restaurée, ce qui nous empêche de voir l'effet de l'AMPK sur les cellules matures. Nous pouvons proposer deux explications à ce phénomène : soit le sh ARN ne s'intègre pas de façon stable dans le génome des érythroblastes, conduisant à la réexpression de l'AMPK, soit cette dernière est due à une sélection des cellules. En effet, l'absence de l'AMPK induit un ralentissement de la prolifération et une faible apoptose qui pourrait être suffisante pour sélectionner les cellules exprimant encore AMPK. Afin de vérifier ces hypothèses, nous testerons prochainement de

nouveaux vecteurs shARN exprimant la GFP afin de suivre le devenir de la population d'érythroblastes n'exprimant plus AMPK.

Effet de l'activation de l'AMPK sur la différenciation érythroïde humaine

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet de l'activation de l'AMPK dans les érythroblastes primaires humains grâce à un activateur direct, le GSK621.

Nous avons commencé par déterminer la cinétique d'activation d'AMPK en conditions physiologiques. Ainsi, au cours de l'érythropoïèse, AMPK est fortement activée dans les érythroblastes immatures et très faiblement activée dans les érythroblastes matures. Cette diminution de l'activation de l'AMPK pourrait être due soit à la diminution de l'expression ou de l'activité de l'une des kinases activatrices de l'AMPK (LKB1, CaMKKβ ou TAK1) soit à l'augmentation de l'expression de phosphatases (PP2CA, PP2CB) ou de kinases (GSK3, PKA, PKB, PKC) responsables de l'inhibition de son activité. D'autre part, une activation de l'AMPK par l'EPO a été démontrée dans plusieurs tissus (adipocytes (Wang et al., 2013a), muscle squelettique (Wang et al., 2013b), cellules endothéliales (Su et al., 2012)). On pourrait ainsi suggérer que la diminution de l'activation de l'AMPK dans les érythroblastes matures pourrait être due à la diminution de l'expression de l'EPOR à partir du stade baso-E (Gautier et al., 2016a).

L'effet délétère de l'activation d'AMPK observé en fin de différenciation montre l'importance et le caractère crucial de la diminution de son activation pour la survie et la différenciation des érythroblastes matures. Pour expliquer la dichotomie dans la cinétique d'activation d'AMPK et son effet sur les érythroblastes, on pourrait supposer que les stades immatures sont des stades prolifératifs nécessitant beaucoup d'énergie. AMPK est alors fortement activée afin de réguler la biogenèse mitochondriale et induire une augmentation de la phosphorylation oxydative et fournir l'ATP nécessaire à la différenciation. A l'inverse, les érythroblastes matures sont moins prolifératifs, ils utilisent la glycolyse anaérobie (Kim et al., 1991) pour produire de l'énergie. En effet à partir du stade baso-E les mitochondries sont dépolarisées et une première vague de mitophagie à lieu à partir du stade poly-E (Betin et al., 2013). Ainsi, une induction de la biogenèse mitochondriale par activation de l'AMPK dans les cellules qui ont besoin d'éliminer leurs mitochondries pourrait altérer leur homéostasie et induire une accumulation de ROS conduisant à la mort des cellules.

Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser l'activation directe par l'AMPK du principal régulateur de la biogenèse mitochondriale PGC-1 (Jäger et al., 2007) et de mesurer les taux de production des ROS et d'ATP au cours de la différenciation en présence

de l'activateur de l'AMPK. Bien que la mesure de l'ATP soit délicate puisque la production et la consommation de l'ATP est un processus dynamique difficile à mesurer à un temps donné. Dans notre étude, la phosphorylation du substrat direct d'AMPK, ACC-S79 a été utilisée comme marqueur de l'activité de l'AMPK. Il serait intéressant d'étudier l'effet de cette phosphorylation sur le métabolisme lipidique des érythroblastes en mesurant par exemple la formation des triglycérides qui devrait être diminuée en présence de GSK621. Une analyse plus globale de l'expression des gènes du métabolisme peut être réalisée par la technologie microfluidique développée par Fluidigm (Zhang et al., 2014). Ces expériences nous permettraient de déterminer si le rôle de l'AMPK au cours de l'érythropoïèse est dépendant ou non de sa fonction de régulateur du métabolisme énergétique.

D'autre part, une étude réalisée par Obba et al. a démontré un rôle de l'AMPK dans la différenciation des monocytes en macrophages. Les caractéristiques globales de la différenciation macrophagique et érythroïde sont assez similaires. En effet, ces deux processus de différenciation nécessitent une activation transitoire des caspases et une induction de l'autophagie. Au cours de l'érythropoïèse, l'implication de l'autophagie dans l'élimination des organelles au stade poly-E (Betin et al., 2013) et dans l'élimination des mitochondries permettant la maturation des réticulocytes a été démontrée (Schweers et al., 2007) (Mortensen et al., 2010). Au cours de la différenciation macrophagique, l'implication de la voie CaMKKβ-AMPK-ULK1 dans l'induction d'une autophagie nécessaire à la différentiation médiée par le CSF1 a été mise en évidence (Jacquel et al., 2012) (Obba et al., 2015). Ainsi, au cours de cette différenciation, l'expression et l'activation de l'AMPK sont augmentées induisant une activation de l'autophagie permettant la différenciation macrophagique. À l'inverse, au cours de l'érythropoïèse, l'expression de l'AMPK est constante mais son activation ainsi que l'activation de ULK1 diminuent dans les stades matures. Dans notre modèle, l'activation de l'AMPK dans les stades immatures semble importante pour la régulation de leur survie, prolifération et leur différenciation, cependant, contrairement à la différenciation macrophagique, l'autophagie nécessaire à la différenciation des érythroblastes semble être indépendante de l'AMPK puisque son activation diminue dans les stades matures.

Finalement, l'utilisation d'activateurs directs de l'AMPK est envisagée pour le traitement thérapeutique de plusieurs pathologies (Cancers dont LAM et syndromes métaboliques). En effet, comme décrit dans l'introduction (VI, B, 4, c), une étude réalisée au laboratoire a

démontré l'intérêt de l'activation de l'AMPK par le GSK621 afin d'induire la mort des blastes de LAM (Sujobert et al., 2015). D'autre part, chez l'homme et les modèles animaux de néphropathie diabétique, une diminution de la phosphorylation de l'AMPK (T172) est corrélée avec une diminution de la fonction rénale. Ainsi, des travaux ont permis de développer de nouveaux activateurs directs de l'AMPK (β1 sélectifs), le PF-06409577 et le PF-249, et de démontrer un effet bénéfique d'un traitement chronique sur la réduction de la progression de la néphropathie diabétique chez le rat (Salatto et al., 2017). Ces activateurs ont été utilisés dans des essais cliniques de phase I, cependant les recherches se sont arrêtées à cette phase. D'autres travaux ont démontré grâce à l'utilisation des activateurs directs de l'AMPK (non sélectifs d'une isoforme particulière) PF-739 (Cokorinos et al., 2017) et MK-8722 (Myers et al., 2017) que l'activation de l'AMPK dans le muscle chez le singe, induit une augmentation de la consommation du glucose et une diminution de son taux systémique. Ces études démontrent l'intérêt thérapeutique de l'utilisation des activateurs direct de l'AMPK pour le traitement du diabète de type 2. Un autre activateur direct de l'AMPK, le 0304 a été développé et est utilisé en essai clinique de phase II pour le traitement du diabète via l'induction d'une activation de l'AMPK de nouveau dans le muscle.

Les cellules rénales et hépatiques expriment majoritairement l'isoforme β1 de l'AMPK. Bien que les cellules musculaires expriment majoritairement l'isoforme β2, les activateurs utilisés ne sont pas sélectifs. Il n'existe pas jusqu'à présent d'activateur qui induit l'activation des complexes d'AMPK exprimant uniquement l'isoforme β2. Nos travaux démontrent que les érythroblastes expriment majoritairement les isoformes α1 β1 et γ1, et que l'activation de l'AMPK est délétère pour les stades tardifs de la différenciation. Ainsi les activateurs utilisés dans les tests cliniques (β1 sélectif ou non sélectif β1, β2) peuvent induire une activation de l'AMPK dans la moelle et ainsi la mort des érythroblastes tardifs. Il serait donc important de mesurer les paramètres hématologiques des patients au cours de leur traitement.

Différences entre l'érythropoïèse humaine et murine

L'ensemble de nos résultats démontre que l'AMPK est importante pour la différenciation des cellules érythroïdes humaines alors qu'elle ne semble pas avoir de rôle au cours de l'érythropoïèse murine. Chez la souris, elle est par contre impliquée dans le fonctionnement du globule rouge mature. Cette étude illustre donc un nouveau point de divergence entre l'érythropoïèse murine et l'érythropoïèse humaine. En effet, comme mentionné dans l'introduction (VI, A, 2 b), bien que les érythropoïèses humaine et murine soient globalement similaires, il est connu depuis longtemps qu'il existe des différences entre les deux espèces. On peut citer comme exemples les différences d'expression de GDF15, ALAS2 ou GLUT1.

De plus, les études transcriptomiques réalisées chez l'homme et la souris ont démontré plusieurs différences, à la fois dans l'expression globale des gènes qui diminue durant la différenciation murine contrairement à l'humaine, mais aussi dans l'expression individuelle de certains gènes, comme des protéines membranaires et des facteurs de transcription (An et al., 2014).

Afin de mieux comprendre les différences et les similarités entre l'érythropoïèse humaine et murine et leurs potentielles conséquences fonctionnelles, le laboratoire a réalisé récemment une analyse protéomique globale de l'érythropoïèse humaine (Gautier et al., 2016a) et réalise actuellement une analyse similaire de l'érythropoïèse murine.

À ce stade de l'étude, la comparaison du protéome des érythroblastes humains et de celui des érythroblastes murins démontre peu de différences dans le profil d'expression protéique entre les deux espèces. Toutefois, nous pouvons observer des différences dans le profil d'expression des protéines impliquées dans le cycle cellulaire (cytokinèse et ségrégation des chromosomes) et des facteurs de transcription entre les différents stades de maturation des érythroblastes.

Le rôle de l'AMPK dans la régulation du cycle cellulaire et l'induction de la mitose a été démontré (introduction B, 3, b), (2), (b)). De plus, nos résultats montrent que l'absence ou l'activation de l'AMPK affecte la prolifération des érythroblastes humains alors qu'elle n'a aucun effet sur les érythroblastes murins. L'analyse des résultats obtenus par les études protéomiques pourrait nous permettre de mettre en évidence des cibles de l'AMPK qui seraientt impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et qui seraient différentiellement exprimées dans l'érythropoïèse humaine et murine.

D'autre part, l'analyse protéomique a permis d'observer des différences dans le niveau d'expression relatif des facteurs de transcription entre les érythroblastes humains et murins. Ainsi, il se peut que ces différences modifient la stœchiométrie des facteurs concernés et donc la composition des complexes transcriptionnels dans lesquels ils sont impliqués. Cela pourrait donc modifier significativement le profil d'expression protéique des gènes régulés par ces facteurs de transcription. Ces études pourraient nous permettre d'identifier d'éventuels substrats de l'AMPK qui seraient différentiellement exprimés entre les deux espèces, ce qui pourrait potentiellement expliquer les discordances observées dans le rôle de l'AMPK au cours de l'érythropoïèse humaine et murine.

Références bibliographiques

XIII. Références bibliographiques

Adams, W.C., Chen, Y.-H., Kratchmarov, R., Yen, B., Nish, S.A., Lin, W.-H.W., Rothman, N.J., Luchsinger, L.L., Klein, U., Busslinger, M., et al. (2016). Anabolism-associated Mitochondrial Stasis Driving Lymphocyte Differentiation over Self-renewal. Cell Rep. *17*, 3142–3152.

Amireault, P., Hatia, S., Bayard, E., Bernex, F., Collet, C., Callebert, 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. *108*, 13141–13146.

An, X., Schulz, V.P., Li, J., Wu, K., Liu, J., Xue, F., Hu, J., Mohandas, N., and Gallagher, P.G. (2014). Global transcriptome analyses of human and murine terminal erythroid differentiation. Blood *123*, 3466–3477.

Anderson, D.M., Lyman, S.D., Baird, A., Wignall, J.M., Eisenman, J., Rauch, C., March, C.J., Boswell, H.S., Gimpel, S.D., and Cosman, D. (1990). Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. Cell *63*, 235–243.

Angin, Y., Beauloye, C., Horman, S., and Bertrand, L. (2016). Regulation of Carbohydrate Metabolism, Lipid Metabolism, and Protein Metabolism by AMPK. EXS *107*, 23–43.

Anisimov, V.N., Egormin, P.A., Bershtein, L.M., Zabezhinskii, M.A., Piskunova, T.S., Popovich, I.G., and Semenchenko, A.V. (2005). Metformin decelerates aging and development of mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. Bull. Exp. Biol. Med. *139*, 721–723.

Anong, W.A., Franco, T., Chu, H., Weis, T.L., Devlin, E.E., Bodine, D.M., An, X., Mohandas, N., and Low, P.S. (2009). Adducin forms a bridge between the erythrocyte membrane and its cytoskeleton and regulates membrane cohesion. Blood *114*, 1904–1912.

Arcasoy, M.O., and Jiang, X. (2005). Co-operative signalling mechanisms required for erythroid precursor expansion in response to erythropoietin and stem cell factor. Br. J. Haematol. *130*, 121–129.

Auffray, I., Marfatia, S., de Jong, K., Lee, G., Huang, C.H., Paszty, C., Tanner, M.J., Mohandas, N., and Chasis, J.A. (2001). Glycophorin A dimerization and band 3 interaction during erythroid membrane biogenesis: in vivo studies in human glycophorin A transgenic mice. Blood *97*, 2872–2878.

Baas, A.F., Boudeau, J., Sapkota, G.P., Smit, L., Medema, R., Morrice, N.A., Alessi, D.R., and Clevers, H.C. (2003). Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD. EMBO J. *22*, 3062–3072.

Bandow, K., Kusuyama, J., Kakimoto, K., Ohnishi, T., and Matsuguchi, T. (2015). AMP-activated protein kinase (AMPK) activity negatively regulates chondrogenic differentiation. Bone *74*, 125–133.

Banko, M.R., Allen, J.J., Schaffer, B.E., Wilker, E.W., Tsou, P., White, J.L., Villén, J., Wang, B., Kim, S.R., Sakamoto, K., et al. (2011). Chemical genetic screen for AMPKα2 substrates uncovers a network of proteins involved in mitosis. Mol. Cell *44*, 878–892.

Battaglia, M., Stabilini, A., and Roncarolo, M.-G. (2005). Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. Blood *105*, 4743–4748.

Berod, L., Friedrich, C., Nandan, A., Freitag, J., Hagemann, S., Harmrolfs, K., Sandouk, A., Hesse, C., Castro, C.N., Bähre, H., et al. (2014). De novo fatty acid synthesis controls the fate between regulatory T and T helper 17 cells. Nat. Med. *20*, 1327–1333.

Besson, A., Dowdy, S.F., and Roberts, J.M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. Dev. Cell *14*, 159–169.

Betin, V.M.S., Singleton, B.K., Parsons, S.F., Anstee, D.J., and Lane, J.D. (2013). Autophagy facilitates organelle clearance during differentiation of human erythroblasts: evidence for a role for ATG4 paralogs during autophagosome maturation. Autophagy *9*, 881–893.

Bolster, D.R., Crozier, S.J., Kimball, S.R., and Jefferson, L.S. (2002). AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. J. Biol. Chem. *277*, 23977–23980.

Bonen, A., Han, X.-X., Habets, D.D.J., Febbraio, M., Glatz, J.F.C., and Luiken, J.J.F.P. (2007). A null mutation in skeletal muscle FAT/CD36 reveals its essential role in insulin- and AICAR-stimulated fatty acid metabolism. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *292*, E1740-1749.

Boudeau, J., Baas, A.F., Deak, M., Morrice, N.A., Kieloch, A., Schutkowski, M., Prescott, A.R., Clevers, H.C., and Alessi, D.R. (2003). MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. EMBO J. *22*, 5102–5114.

Bouscary, D., Pene, F., Claessens, Y.-E., Muller, O., Chrétien, S., Fontenay-Roupie, M., Gisselbrecht, S., Mayeux, P., and Lacombe, C. (2003). Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. Blood *101*, 3436–3443.

Brannan, C.I., Lyman, S.D., Williams, D.E., Eisenman, J., Anderson, D.M., Cosman, D., Bedell, M.A., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (1991). Steel-Dickie mutation encodes a c-kit ligand lacking transmembrane and cytoplasmic domains. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *88*, 4671–4674.

Broudy, V.C., Lin, N.L., Bühring, H.J., Komatsu, N., and Kavanagh, T.J. (1998). Analysis of c-kit receptor dimerization by fluorescence resonance energy transfer. Blood *91*, 898–906.

Browne, G.J., Finn, S.G., and Proud, C.G. (2004). Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398. J. Biol. Chem. *279*, 12220–12231.

Bruce, L.J., Beckmann, R., Ribeiro, M.L., Peters, L.L., Chasis, J.A., Delaunay, J., Mohandas, N., Anstee, D.J., and Tanner, M.J.A. (2003). A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. Blood *101*, 4180–4188.

Buckbinder, L., Talbott, R., Velasco-Miguel, S., Takenaka, I., Faha, B., Seizinger, B.R., and Kley, N. (1995). Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. Nature *377*, 646–649.

Budanov, A.V., and Karin, M. (2008). p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. Cell *134*, 451–460.

Cambridge, E.L., McIntyre, Z., Clare, S., Arends, M.J., Goulding, D., Isherwood, C., Caetano, S.S., Reviriego, C.B., Swiatkowska, A., Kane, L., et al. (2017). The AMP-activated protein kinase beta 1 subunit modulates erythrocyte integrity. Exp. Hematol. *45*, 64–68.e5.

Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J.N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J.C., Elliott, P.J., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD+ metabolism and SIRT1 activity. Nature *458*, 1056–1060.

Carling, D., Clarke, P.R., Zammit, V.A., and Hardie, D.G. (1989). Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. Eur. J. Biochem. *186*, 129–136.

Chan, E.Y.W., Longatti, A., McKnight, N.C., and Tooze, S.A. (2009). Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. Mol. Cell. Biol. *29*, 157–171.

Chang, J.T., Palanivel, V.R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Longworth, S.A., Vinup, K.E., Mrass, P., Oliaro, J., et al. (2007). Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. Science *315*, 1687–1691.

Chaudhuri, A., Zbrzezna, V., Johnson, C., Nichols, M., Rubinstein, P., Marsh, W.L., and Pogo, A.O. (1989). Purification and characterization of an erythrocyte membrane protein complex carrying Duffy blood group antigenicity. Possible receptor for Plasmodium vivax and Plasmodium knowlesi malaria parasite. J. Biol. Chem. *264*, 13770–13774.

Chaudhuri, A., Zbrzezna, V., Polyakova, J., Pogo, A.O., Hesselgesser, J., and Horuk, R. (1994). Expression of the Duffy antigen in K562 cells. Evidence that it is the human erythrocyte chemokine receptor. J. Biol. Chem. *269*, 7835–7838.

Chen, K., Liu, J., Heck, S., Chasis, J.A., An, X., and Mohandas, N. (2009). Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 17413–17418.

Chen, L., Chen, Q., Deng, G., Kuang, S., Lian, J., Wang, M., and Zhu, H. (2016). AMPK activation by GSK621 inhibits human melanoma cells in vitro and in vivo. Biochem. Biophys. Res. Commun. *480*, 515–521.

Cheung, P.C., Salt, I.P., Davies, S.P., Hardie, D.G., and Carling, D. (2000). Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. Biochem. J. *346 Pt 3*, 659–669.

Chou, S.T., Khandros, E., Bailey, L.C., Nichols, K.E., Vakoc, C.R., Yao, Y., Huang, Z., Crispino, J.D., Hardison, R.C., Blobel, G.A., et al. (2009). Graded repression of PU.1/Sfpi1 gene transcription by GATA factors regulates hematopoietic cell fate. Blood *114*, 983–994.

Chung, J., Bauer, D.E., Ghamari, A., Nizzi, C.P., Deck, K.M., Kingsley, P.D., Yien, Y.Y., Huston, N.C., Chen, C., Schultz, I.J., et al. (2015). The mTORC1/4E-BP pathway coordinates hemoglobin production with L-leucine availability. Sci. Signal. *8*, ra34.

Cokorinos, E.C., Delmore, J., Reyes, A.R., Albuquerque, B., Kjøbsted, R., Jørgensen, N.O., Tran, J.-L., Jatkar, A., Cialdea, K., Esquejo, R.M., et al. (2017). Activation of Skeletal Muscle AMPK Promotes Glucose Disposal and Glucose Lowering in Non-human Primates and Mice. Cell Metab. *25*, 1147–1159.e10.

Cool, B., Zinker, B., Chiou, W., Kifle, L., Cao, N., Perham, M., Dickinson, R., Adler, A., Gagne, G., Iyengar, R., et al. (2006). Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. Cell Metab. *3*, 403–416.

Corton, J.M., Gillespie, J.G., Hawley, S.A., and Hardie, D.G. (1995). 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? Eur. J. Biochem. *229*, 558–565.

Costford, S.R., Kavaslar, N., Ahituv, N., Chaudhry, S.N., Schackwitz, W.S., Dent, R., Pennacchio, L.A., McPherson, R., and Harper, M.-E. (2007). Gain-of-function R225W mutation in human AMPKgamma(3) causing increased glycogen and decreased triglyceride in skeletal muscle. PloS One *2*, e903.

Crute, B.E., Seefeld, K., Gamble, J., Kemp, B.E., and Witters, L.A. (1998). Functional Domains of the α1 Catalytic Subunit of the AMP-activated Protein Kinase. J. Biol. Chem. *273*, 35347–35354.

Dang, E.V., Barbi, J., Yang, H.-Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., Bordman, Z., Fu, J., Kim, Y., Yen, H.-R., et al. (2011). Control of TH17/Treg Balance by Hypoxia-Inducible Factor 1. Cell *146*, 772–784.

Davies, S.P., Helps, N.R., Cohen, P.T., and Hardie, D.G. (1995). 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. FEBS Lett. *377*, 421–425.

Dazy, S., Damiola, F., Parisey, N., Beug, H., and Gandrillon, O. (2003). The MEK-1/ERKs signalling pathway is differentially involved in the self-renewal of early and late avian erythroid progenitor cells. Oncogene *22*, 9205–9216.

De Maria, R., Zeuner, A., Eramo, A., Domenichelli, C., Bonci, D., Grignani, F., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Testa, U., and Peschle, C. (1999). Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. Nature *401*, 489–493.

Delgoffe, G.M., Kole, T.P., Zheng, Y., Zarek, P.E., Matthews, K.L., Xiao, B., Worley, P.F., Kozma, S.C., and Powell, J.D. (2009). mTOR differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. Immunity *30*, 832–844.

Dite, T.A., Ling, N.X.Y., Scott, J.W., Hoque, A., Galic, S., Parker, B.L., Ngoei, K.R.W., Langendorf, C.G., O'Brien, M.T., Kundu, M., et al. (2017). The autophagy initiator ULK1 sensitizes AMPK to allosteric drugs. Nat. Commun. *8*, 571.

Djouder, N., Tuerk, R.D., Suter, M., Salvioni, P., Thali, R.F., Scholz, R., Vaahtomeri, K., Auchli, Y., Rechsteiner, H., Brunisholz, R.A., et al. (2010). PKA phosphorylates and inactivates AMPKalpha to promote efficient lipolysis. EMBO J. *29*, 469–481.

Duca, F.A., Côté, C.D., Rasmussen, B.A., Zadeh-Tahmasebi, M., Rutter, G.A., Filippi, B.M., and Lam, T.K.T. (2015). Metformin activates a duodenal Ampk-dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats. Nat. Med. *21*, 506–511.

Edwards, C.R., Ritchie, W., Wong, J.J.-L., Schmitz, U., Middleton, R., An, X., Mohandas, N., Rasko, J.E.J., and Blobel, G.A. (2016). A dynamic intron retention program in the mammalian megakaryocyte and erythrocyte lineages. Blood.

Elliott, S., and Sinclair, A.M. (2012). The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells. Biol. Targets Ther. *6*, 163–189.

Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. Cell *33*, 389–396.

Faubert, B., Boily, G., Izreig, S., Griss, T., Samborska, B., Dong, Z., Dupuy, F., Chambers, C., Fuerth, B.J., Viollet, B., et al. (2013). AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. Cell Metab. *17*, 113–124.

Feng, Z., Hu, W., de Stanchina, E., Teresky, A.K., Jin, S., Lowe, S., and Levine, A.J. (2007). The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. Cancer Res. *67*, 3043–3053.

Finger, C., Escher, C., and Schneider, D. (2009). The single transmembrane domains of human receptor tyrosine kinases encode self-interactions. Sci. Signal. *2*, ra56.

Flygare, J., Rayon Estrada, V., Shin, C., Gupta, S., and Lodish, H.F. (2011). HIF1alpha synergizes with glucocorticoids to promote BFU-E progenitor self-renewal. Blood *117*, 3435–3444.

Föller, M., Sopjani, M., Koka, S., Gu, S., Mahmud, H., Wang, K., Floride, E., Schleicher, E., Schulz, E., Münzel, T., et al. (2009). Regulation of erythrocyte survival by AMP-activated protein kinase. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *23*, 1072–1080.

Forejtnikovà, H., Vieillevoye, M., Zermati, Y., Lambert, M., Pellegrino, R.M., Guihard, S., Gaudry, M., Camaschella, C., Lacombe, C., Roetto, A., et al. (2010). Transferrin receptor 2 is a component of the erythropoietin receptor complex and is required for efficient erythropoiesis. Blood *116*, 5357–5367.

Foretz, M., Guihard, S., Leclerc, J., Fauveau, V., Couty, J.-P., Andris, F., Gaudry, M., Andreelli, F., Vaulont, S., and Viollet, B. (2010a). Maintenance of red blood cell integrity by AMP-activated protein kinase alpha1 catalytic subunit. FEBS Lett. *584*, 3667–3671.

Foretz, M., Guihard, S., Leclerc, J., Fauveau, V., Couty, J.-P., Andris, F., Gaudry, M., Andreelli, F., Vaulont, S., and Viollet, B. (2010b). Maintenance of red blood cell integrity by AMP-activated protein kinase α1 catalytic subunit. FEBS Lett. *584*, 3667–3671.

Foretz, M., Hébrard, S., Guihard, S., Leclerc, J., Do Cruzeiro, M., Hamard, G., Niedergang, F., Gaudry, M., and Viollet, B. (2011a). The AMPKγ1 subunit plays an essential role in erythrocyte membrane elasticity, and its genetic inactivation induces splenomegaly and anemia. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *25*, 337–347.

Foretz, M., Hébrard, S., Guihard, S., Leclerc, J., Do Cruzeiro, M., Hamard, G., Niedergang, F., Gaudry, M., and Viollet, B. (2011b). The AMPKγ1 subunit plays an essential role in erythrocyte membrane elasticity, and its genetic inactivation induces splenomegaly and anemia. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *25*, 337–347.

Gabbianelli, M., and Testa, U. (2009). Role of stem cell factor in the reactivation of human fetal hemoglobin. Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis. *1*, e2009009.

Gallagher, P.G. (2017). Disorders of erythrocyte hydration. Blood blood-2017-04-590810.

Gamberi, T., Modesti, A., Magherini, F., D'Souza, D.M., Hawke, T., and Fiaschi, T. (2016). Activation of autophagy by globular adiponectin is required for muscle differentiation. Biochim. Biophys. Acta *1863*, 694–702.

Gan, B., Hu, J., Jiang, S., Liu, Y., Sahin, E., Zhuang, L., Fletcher-Sananikone, E., Colla, S., Wang, Y.A., Chin, L., et al. (2010a). Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. Nature *468*, 701–704.

Gan, B., Hu, J., Jiang, S., Liu, Y., Sahin, E., Zhuang, L., Fletcher-Sananikone, E., Colla, S., Wang, Y.A., Chin, L., et al. (2010b). Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. Nature *468*, 701–704.

Gan, H.K., Seruga, B., and Knox, J.J. (2009). Sunitinib in solid tumors. Expert Opin. Investig. Drugs *18*, 821–834.

Garcia, D., and Shaw, R.J. (2017). AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. Mol. Cell *66*, 789–800.

Gauthier, E., Guo, X., Mohandas, N., and An, X. (2011). Phosphorylation-dependent perturbations of the 4.1R-associated multiprotein complex of the erythrocyte membrane. Biochemistry (Mosc.) *50*, 4561–4567.

Gautier, E.-F., Ducamp, S., Leduc, M., Salnot, V., Guillonneau, F., Dussiot, M., Hale, J., Giarratana, M.-C., Raimbault, A., Douay, L., et al. (2016a). Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis. Cell Rep. *16*, 1470–1484.

Gautier, E.F., Ducamp, S., Leduc, M., Salnot, V., Guillonneau, F., Dussiot, M., Hale, J., Giarratana, M.C., Raimbault, A., Douay, L., et al. (2016b). Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis. Cell Rep. *16*, 1470–1484.

Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. Science *327*, 656–661.

Gómez-Galeno, J.E., Dang, Q., Nguyen, T.H., Boyer, S.H., Grote, M.P., Sun, Z., Chen, M., Craigo, W.A., van Poelje, P.D., MacKenna, D.A., et al. (2010). A Potent and Selective AMPK Activator That Inhibits de Novo Lipogenesis. ACS Med. Chem. Lett. *1*, 478–482.

Göransson, O., McBride, A., Hawley, S.A., Ross, F.A., Shpiro, N., Foretz, M., Viollet, B., Hardie, D.G., and Sakamoto, K. (2007). Mechanism of Action of A-769662, a Valuable Tool for Activation of AMP-activated Protein Kinase. J. Biol. Chem. *282*, 32549–32560.

Gregory, C.J., and Eaves, A.C. (1977). Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses. Blood *49*, 855–864.

Gregory, C.J., and Eaves, A.C. (1978). Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. Blood *51*, 527–537.

Guigas, B., and Viollet, B. (2016). Targeting AMPK: From Ancient Drugs to New Small-Molecule Activators. EXS *107*, 327–350.

Guo, G., Luc, S., Marco, E., Lin, T.-W., Peng, C., Kerenyi, M.A., Beyaz, S., Kim, W., Xu, J., Das, P.P., et al. (2013). Mapping cellular hierarchy by single-cell analysis of the cell surface repertoire. Cell Stem Cell *13*, 492–505.

Gurumurthy, S., Xie, S.Z., Alagesan, B., Kim, J., Yusuf, R.Z., Saez, B., Tzatsos, A., Ozsolak, F., Milos, P., Ferrari, F., et al. (2010a). The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. Nature *468*, 659–663.

Gurumurthy, S., Xie, S.Z., Alagesan, B., Kim, J., Yusuf, R.Z., Saez, B., Tzatsos, A., Ozsolak, F., Milos, P., Ferrari, F., et al. (2010b). The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. Nature *468*, 659–663.

Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. Mol. Cell *30*, 214–226.

Harandi, O.F., Hedge, S., Wu, D.-C., McKeone, D., and Paulson, R.F. (2010). Murine erythroid short-term radioprotection requires a BMP4-dependent, self-renewing population of stress erythroid progenitors. J. Clin. Invest. *120*, 4507–4519.

Hardie, D.G. (2011). AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. Genes Dev. *25*, 1895–1908.

Hardie, D.G. (2013). AMPK: A Target for Drugs and Natural Products With Effects on Both Diabetes and Cancer. Diabetes *62*, 2164–2172.

Hardie, D.G., and Pan, D.A. (2002). Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. Biochem. Soc. Trans. *30*, 1064–1070.

Hardie, D.G., Ross, F.A., and Hawley, S.A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *13*, 251–262.

Hardison, R.C. (2012). Evolution of Hemoglobin and Its Genes. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *2*.

Hawley, S.A., Davison, M., Woods, A., Davies, S.P., Beri, R.K., Carling, D., and Hardie, D.G. (1996). Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and

identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. J. Biol. Chem. *271*, 27879–27887.

Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Mäkelä, T.P., Alessi, D.R., and Hardie, D.G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. J. Biol. *2*, 28.

Hawley, S.A., Pan, D.A., Mustard, K.J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A.M., Frenguelli, B.G., and Hardie, D.G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. Cell Metab. *2*, 9–19.

Hawley, S.A., Ross, F.A., Chevtzoff, C., Green, K.A., Evans, A., Fogarty, S., Towler, M.C., Brown, L.J., Ogunbayo, O.A., Evans, A.M., et al. (2010). Use of Cells Expressing γ Subunit Variants to Identify Diverse Mechanisms of AMPK Activation. Cell Metab. *11*, 554–565.

Hawley, S.A., Fullerton, M.D., Ross, F.A., Schertzer, J.D., Chevtzoff, C., Walker, K.J., Peggie, M.W., Zibrova, D., Green, K.A., Mustard, K.J., et al. (2012). The Ancient Drug Salicylate Directly Activates AMP-Activated Protein Kinase. Science *336*, 918–922.

He, G., Zhang, Y.-W., Lee, J.-H., Zeng, S.X., Wang, Y.V., Luo, Z., Dong, X.C., Viollet, B., Wahl, G.M., and Lu, H. (2014). AMP-activated protein kinase induces p53 by phosphorylating MDMX and inhibiting its activity. Mol. Cell. Biol. *34*, 148–157.

Heathcote, H.R., Mancini, S.J., Strembitska, A., Jamal, K., Reihill, J.A., Palmer, T.M., Gould, G.W., and Salt, I.P. (2016). Protein kinase C phosphorylates AMP-activated protein kinase α1 Ser487., Protein kinase C phosphorylates AMP-activated protein kinase α1 Ser487. Biochem. J. Biochem. J. *473*, *473*, 4681, 4681–4697.

Hemminki, A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M., Höglund, P., et al. (1998). A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. Nature *391*, 184–187.

Henin, N., Vincent, M.F., and Van den Berghe, G. (1996). Stimulation of rat liver AMP-activated protein kinase by AMP analogues. Biochim. Biophys. Acta *1290*, 197–203.

Hiroyama, T., Miharada, K., Sudo, K., Danjo, I., Aoki, N., and Nakamura, Y. (2008). Establishment of mouse embryonic stem cell-derived erythroid progenitor cell lines able to produce functional red blood cells. PloS One *3*, e1544.

Hochegger, H., Takeda, S., and Hunt, T. (2008). Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 910–916.

Hresko, R.C., and Mueckler, M. (2005). mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. J. Biol. Chem. *280*, 40406–40416.

Hu, J., Liu, J., Xue, F., Halverson, G., Reid, M., Guo, A., Chen, L., Raza, A., Galili, N., Jaffray, J., et al. (2013). Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. Blood *121*, 3246–3253.

Hunter, R.W., Foretz, M., Bultot, L., Fullerton, M.D., Deak, M., Ross, F.A., Hawley, S.A., Shpiro, N., Viollet, B., Barron, D., et al. (2014). Mechanism of Action of Compound-13: An α1-Selective Small Molecule Activator of AMPK. Chem. Biol. *21*, 866–879.

Hurley, R.L., Anderson, K.A., Franzone, J.M., Kemp, B.E., Means, A.R., and Witters, L.A. (2005). The Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. J. Biol. Chem. *280*, 29060–29066.

Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., et al. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. Nature *408*, 488–492.

Imbulgoda, A., Heng, D.Y.C., and Kollmannsberger, C. (2014). Sunitinib in the treatment of advanced solid tumors. Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer *201*, 165–184.

Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. Cell *115*, 577–590.

Jacquel, A., Obba, S., Boyer, L., Dufies, M., Robert, G., Gounon, P., Lemichez, E., Luciano, F., Solary, E., and Auberger, P. (2012). Autophagy is required for CSF-1-induced macrophagic differentiation and acquisition of phagocytic functions. Blood *119*, 4527–4531.

Jäger, S., Handschin, C., St-Pierre, J., and Spiegelman, B.M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 12017–12022.

Jeon, S.-M. (2016). Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. Exp. Mol. Med. *48*, e245.

Jeon, S.-M., Chandel, N.S., and Hay, N. (2012). AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. Nature *485*, 661–665.

Jewell, J.L., Russell, R.C., and Guan, K.-L. (2013). Amino acid signalling upstream of mTOR. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *14*, 133–139.

Jiang, H., Liu, W., Zhan, S.-K., Pan, Y.-X., Bian, L.-G., Sun, B., Sun, Q.-F., and Pan, S.-J. (2016). GSK621 Targets Glioma Cells via Activating AMP-Activated Protein Kinase Signalings. PLOS ONE *11*, e0161017.

Jin, X., Townley, R., and Shapiro, L. (2007). Structural insight into AMPK regulation: ADP comes into play. Struct. Lond. Engl. 1993 *15*, 1285–1295.

Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J., and Thompson, C.B. (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. Mol. Cell *18*, 283–293.

Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. Mol. Biol. Cell *20*, 1992–2003.

Kapur, R., Cooper, R., Xiao, X., Weiss, M.J., Donovan, P., and Williams, D.A. (1999). The presence of novel amino acids in the cytoplasmic domain of stem cell factor results in hematopoietic defects in Steel(17H) mice. Blood *94*, 1915–1925.

Kaur, J., and Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *16*, 461–472.

Kerkela, R., Woulfe, K.C., Durand, J., Vagnozzi, R., Kramer, D., Chu, T.F., Beahm, C., Chen, M.H., and Force, T. (2009). Sunitinib-Induced Cardiotoxicity Is Mediated by Off-Target Inhibition of AMP-Activated Protein Kinase. Clin. Transl. Sci. *2*, 15–25.

Khan, A.A., Hanada, T., Mohseni, M., Jeong, J.-J., Zeng, L., Gaetani, M., Li, D., Reed, B.C., Speicher, D.W., and Chishti, A.H. (2008). Dematin and adducin provide a novel link between the spectrin cytoskeleton and human erythrocyte membrane by directly interacting with glucose transporter-1. J. Biol. Chem. *283*, 14600–14609.

Kim, J., and Dang, C.V. (2006). Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. Cancer Res. *66*, 8927–8930.

Kim, E.-K., Lim, S., Park, J.-M., Seo, J.K., Kim, J.H., Kim, K.T., Ryu, S.H., and Suh, P.-G. (2012). Human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by AMP-activated protein kinase. J. Cell. Physiol. *227*, 1680–1687.

Kim, H.D., Koury, M.J., Lee, S.J., Im, J.H., and Sawyer, S.T. (1991). Metabolic adaptation during erythropoietin-mediated terminal differentiation of mouse erythroid cells. Blood *77*, 387–392.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011a). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. Nat. Cell Biol. *13*, 132–141.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011b). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. Nat. Cell Biol. *13*, 132–141.

Kim, J., Kim, Y.C., Fang, C., Russell, R.C., Kim, J.H., Fan, W., Liu, R., Zhong, Q., and Guan, K.-L. (2013). Differential Regulation of Distinct Vps34 Complexes by AMPK in Nutrient Stress and Autophagy. Cell *152*, 290–303.

Kingsley, P.D., Malik, J., Fantauzzo, K.A., and Palis, J. (2004). Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. Blood *104*, 19–25.

Koay, A., Rimmer, K.A., Mertens, H.D.T., Gooley, P.R., and Stapleton, D. (2007). Oligosaccharide recognition and binding to the carbohydrate binding module of AMP-activated protein kinase. FEBS Lett. *581*, 5055–5059.

Komatsu, N., Nakauchi, H., Miwa, A., Ishihara, T., Eguchi, M., Moroi, M., Okada, M., Sato, Y., Wada, H., and Yawata, Y. (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*, 341–348.

Koren, I., Reem, E., and Kimchi, A. (2010). DAP1, a novel substrate of mTOR, negatively regulates autophagy. Curr. Biol. CB *20*, 1093–1098.

Korsgren, C., Peters, L.L., and Lux, S.E. (2010). Protein 4.2 binds to the carboxyl-terminal EF-hands of erythroid alpha-spectrin in a calcium- and calmodulin-dependent manner. J. Biol. Chem. *285*, 4757–4770.

Koury, M.J., Koury, S.T., Kopsombut, P., and Bondurant, M.C. (2005). In vitro maturation of nascent reticulocytes to erythrocytes. Blood *105*, 2168–2174.

Krause, U., Bertrand, L., and Hue, L. (2002). Control of p70 ribosomal protein S6 kinase and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein phosphatases in isolated hepatocytes. Eur. J. Biochem. *269*, 3751–3759.

Kudo, N., Gillespie, J.G., Kung, L., Witters, L.A., Schulz, R., Clanachan, A.S., and Lopaschuk, G.D. (1996). Characterization of 5'AMP-activated protein kinase activity in the heart and its role in inhibiting acetyl-CoA carboxylase during reperfusion following ischemia. Biochim. Biophys. Acta *1301*, 67–75.

Kundu, M., Lindsten, T., Yang, C.-Y., Wu, J., Zhao, F., Zhang, J., Selak, M.A., Ney, P.A., and Thompson, C.B. (2008). Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. Blood *112*, 1493–1502.

Laderoute, K.R., Amin, K., Calaoagan, J.M., Knapp, M., Le, T., Orduna, J., Foretz, M., and Viollet, B. (2006). 5′-AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is Induced by Low-Oxygen and Glucose Deprivation Conditions Found in Solid-Tumor Microenvironments. Mol. Cell. Biol. *26*, 5336–5347.

Laderoute, K.R., Calaoagan, J.M., Madrid, P.B., Klon, A.E., and Ehrlich, P.J. (2010). SU11248 (sunitinib) directly inhibits the activity of mammalian 5′-AMP-activated protein kinase (AMPK). Cancer Biol. Ther. *10*, 68–76.

Lan, F., Cacicedo, J.M., Ruderman, N., and Ido, Y. (2008). SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. J. Biol. Chem. *283*, 27628–27635.

Lee, H., Park, H.J., Park, C.-S., Oh, E.-T., Choi, B.-H., Williams, B., Lee, C.K., and Song, C.W. (2014). Response of breast cancer cells and cancer stem cells to metformin and hyperthermia alone or combined. PloS One *9*, e87979.

Li, C., Liu, V.W., Chiu, P.M., Chan, D.W., and Ngan, H.Y. (2012). Over-expressions of AMPK subunits in ovarian carcinomas with significant clinical implications. BMC Cancer *12*, 357.

Li, J., Hale, J., Bhagia, P., Xue, F., Chen, L., Jaffray, J., Yan, H., Lane, J., Gallagher, P.G., Mohandas, N., et al. (2014). Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors: BFU-E and CFU-E. Blood *124*, 3636–3645.

Li, X., Han, Y., Pang, W., Li, C., Xie, X., Shyy, J.Y.-J., and Zhu, Y. (2008). AMP-activated protein kinase promotes the differentiation of endothelial progenitor cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *28*, 1789–1795.

Li, X., Wang, L., Zhou, X.E., Ke, J., de Waal, P.W., Gu, X., Tan, M.H.E., Wang, D., Wu, D., Xu, H.E., et al. (2015). Structural basis of AMPK regulation by adenine nucleotides and glycogen. Cell Res. *25*, 50–66.

Liang, J., Shao, S.H., Xu, Z.-X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., Kondo, S., Dumont, D.J., Gutterman, J.U., Walker, C.L., et al. (2007a). The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. Nat. Cell Biol. *9*, 218–224.

Liang, J., Shao, S.H., Xu, Z.-X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., Kondo, S., Dumont, D.J., Gutterman, J.U., Walker, C.L., et al. (2007b). The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. Nat. Cell Biol. *9*, 218–224.

von Lindern, M., Zauner, W., Mellitzer, G., Steinlein, P., Fritsch, G., Huber, K., Löwenberg, B., and Beug, H. (1999). The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro. Blood *94*, 550–559.

Liu, J., Guo, X., Mohandas, N., Chasis, J.A., and An, X. (2010). Membrane remodeling during reticulocyte maturation. Blood *115*, 2021–2027.

Liu, J., Mohandas, N., and An, X. (2011). Membrane assembly during erythropoiesis. Curr. Opin. Hematol. *18*, 133–138.

Liu, L., Feng, D., Chen, G., Chen, M., Zheng, Q., Song, P., Ma, Q., Zhu, C., Wang, R., Qi, W., et al. (2012). Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. Nat. Cell Biol. *14*, 177–185.

Liu, W., Mao, L., Ji, F., Chen, F., Hao, Y., Liu, G., Liu, W., Mao, L., Ji, F., Chen, F., et al. (2017). Targeted activation of AMPK by GSK621 ameliorates H 2 O 2 -induced damages in osteoblasts. Oncotarget *8*, 10543–10552.

Liu, X., Chhipa, R.R., Nakano, I., and Dasgupta, B. (2014). The AMPK Inhibitor Compound C Is a Potent AMPK-Independent Antiglioma Agent. Mol. Cancer Ther. *13*, 596–605.

Liu, Y., Pop, R., Sadegh, C., Brugnara, C., Haase, V.H., and Socolovsky, M. (2006). Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. Blood *108*, 123–133.

Lizcano, J.M., Göransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N.A., Boudeau, J., Hawley, S.A., Udd, L., Mäkelä, T.P., Hardie, D.G., et al. (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. EMBO J. *23*, 833–843.

Luck, L., Zeng, L., Hiti, A.L., Weinberg, K.I., and Malik, P. (2004). Human CD34+ and CD34+CD38− hematopoietic progenitors in sickle cell disease differ phenotypically and functionally from normal and suggest distinct subpopulations that generate F cells. Exp. Hematol. *32*, 483–493.

Ma, X.M., and Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 307–318.

Madiraju, A.K., Erion, D.M., Rahimi, Y., Zhang, X.-M., Braddock, D.T., Albright, R.A., Prigaro, B.J., Wood, J.L., Bhanot, S., MacDonald, M.J., et al. (2014). Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. Nature *510*, 542–546.

Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nat. Rev. Cancer *9*, 153–166.

Massillon, D., Stalmans, W., van de Werve, G., and Bollen, M. (1994). Identification of the glycogenic compound 5-iodotubercidin as a general protein kinase inhibitor. Biochem. J. *299*, 123–128.

Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., et al. (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. Nat. Cell Biol. *11*, 385–396.

Merlen, G., Gentric, G., Celton-Morizur, S., Foretz, M., Guidotti, J.E., Fauveau, V., Leclerc, J., Viollet, B., and Desdouets, C. (2014a). AMPKα1 controls hepatocyte proliferation independently of energy balance by regulating Cyclin A2 expression. J. Hepatol. *60*, 152–159.

Merlen, G., Gentric, G., Celton-Morizur, S., Foretz, M., Guidotti, J.-E., Fauveau, V., Leclerc, J., Viollet, B., and Desdouets, C. (2014b). AMPKα1 controls hepatocyte proliferation independently of energy balance by regulating Cyclin A2 expression. J. Hepatol. *60*, 152–159.

Merrill, G.F., Kurth, E.J., Hardie, D.G., and Winder, W.W. (1997). AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. Am. J. Physiol. *273*, E1107-1112.

Michalek, R.D., Gerriets, V.A., Jacobs, S.R., Macintyre, A.N., MacIver, N.J., Mason, E.F., Sullivan, S.A., Nichols, A.G., and Rathmell, J.C. (2011). Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *186*, 3299–3303.

Miyawaki, K., Iwasaki, H., Jiromaru, T., Kusumoto, H., Yurino, A., Sugio, T., Uehara, Y., Odawara, J., Daitoku, S., Kunisaki, Y., et al. (2017). Identification of unipotent megakaryocyte progenitors in human hematopoiesis. Blood *129*, 3332–3343.

Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. Genes Dev. *21*, 2861–2873.

Mohandas, N., and Gallagher, P.G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. Blood *112*, 3939–3948.

Momcilovic, M., Hong, S.-P., and Carlson, M. (2006). Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. J. Biol. Chem. *281*, 25336–25343.

Montel-Hagen, A., Kinet, S., Manel, N., Mongellaz, C., Prohaska, R., Battini, J.-L., Delaunay, J., Sitbon, M., and Taylor, N. (2008a). Erythrocyte Glut1 triggers dehydroascorbic acid uptake in mammals unable to synthesize vitamin C. Cell *132*, 1039–1048.

Montel-Hagen, A., Blanc, L., Boyer-Clavel, M., Jacquet, C., Vidal, M., Sitbon, M., and Taylor, N. (2008b). The Glut1 and Glut4 glucose transporters are differentially expressed during perinatal and postnatal erythropoiesis. Blood *112*, 4729–4738.

Mori, Y., Chen, J.Y., Pluvinage, J.V., Seita, J., and Weissman, I.L. (2015). Prospective isolation of human erythroid lineage-committed progenitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, 9638–9643.

Mortensen, M., Ferguson, D.J.P., Edelmann, M., Kessler, B., Morten, K.J., Komatsu, M., and Simon, A.K. (2010). Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 832–837.

Mueckler, M. (1994). Facilitative glucose transporters. Eur. J. Biochem. *219*, 713–725.

Munugalavadla, V., and Kapur, R. (2005). Role of c-Kit and erythropoietin receptor in erythropoiesis. Crit. Rev. Oncol. Hematol. *54*, 63–75.

Myers, R.W., Guan, H.-P., Ehrhart, J., Petrov, A., Prahalada, S., Tozzo, E., Yang, X., Kurtz, M.M., Trujillo, M., Gonzalez Trotter, D., et al. (2017). Systemic pan-AMPK activator MK-8722 improves glucose homeostasis but induces cardiac hypertrophy. Science *357*, 507–511.

Nakada, D., Saunders, T.L., and Morrison, S.J. (2010a). Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. Nature *468*, 653–658.

Nakada, D., Saunders, T.L., and Morrison, S.J. (2010b). Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. Nature *468*, 653–658.

Nandakumar, S.K., Ulirsch, J.C., and Sankaran, V.G. (2016). Advances in understanding erythropoiesis: evolving perspectives. Br. J. Haematol. *173*, 206–218.

Neubauer, H., Cumano, A., Müller, M., Wu, H., Huffstadt, U., and Pfeffer, K. (1998). Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. Cell *93*, 397–409.

Noda, T., and Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. J. Biol. Chem. *273*, 3963–3966.

Notta, F., Zandi, S., Takayama, N., Dobson, S., Gan, O.I., Wilson, G., Kaufmann, K.B., McLeod, J., Laurenti, E., Dunant, C.F., et al. (2016). Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. Science *351*, aab2116.

Oakhill, J.S., Chen, Z.-P., Scott, J.W., Steel, R., Castelli, L.A., Ling, N., Macaulay, S.L., and Kemp, B.E. (2010). β-Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 19237–19241.

Obba, S., Hizir, Z., Boyer, L., Selimoglu-Buet, D., Pfeifer, A., Michel, G., Hamouda, M.-A., Gonçalvès, D., Cerezo, M., Marchetti, S., et al. (2015). The PRKAA1/AMPKα1 pathway triggers autophagy during CSF1-induced human monocyte differentiation and is a potential target in CMML. Autophagy *11*, 1114–1129.

Oburoglu, L., Tardito, S., Fritz, V., de Barros, S.C., Merida, P., Craveiro, M., Mamede, J., Cretenet, G., Mongellaz, C., An, X., et al. (2014). Glucose and glutamine metabolism regulate human hematopoietic stem cell lineage specification. Cell Stem Cell *15*, 169–184.

Oburoglu, L., Romano, M., Taylor, N., and Kinet, S. (2016). Metabolic regulation of hematopoietic stem cell commitment and erythroid differentiation. Curr. Opin. Hematol. *23*, 198–205.

Ollila, S., and Mäkelä, T.P. (2011). The tumor suppressor kinase LKB1: lessons from mouse models. J. Mol. Cell Biol. *3*, 330–340.

Ouyang, J., Parakhia, R.A., and Ochs, R.S. (2011). Metformin Activates AMP Kinase through Inhibition of AMP Deaminase. J. Biol. Chem. *286*, 1–11.

Palis, J. (2016). Hematopoietic stem cell-independent hematopoiesis: emergence of erythroid, megakaryocyte, and myeloid potential in the mammalian embryo. FEBS Lett. *590*, 3965–3974.

Pantaleo, A., Ferru, E., Carta, F., Mannu, F., Giribaldi, G., Vono, R., Lepedda, A.J., Pippia, P., and Turrini, F. (2010). Analysis of changes in tyrosine and serine phosphorylation of red cell membrane proteins induced by P. falciparum growth. Proteomics *10*, 3469–3479.

Park, H.U., Suy, S., Danner, M., Dailey, V., Zhang, Y., Li, H., Hyduke, D.R., Collins, B.T., Gagnon, G., Kallakury, B., et al. (2009). AMP-activated protein kinase promotes human prostate cancer cell growth and survival. Mol. Cancer Ther. *8*, 733–741.

Pearce, E.L., Walsh, M.C., Cejas, P.J., Harms, G.M., Shen, H., Wang, L.-S., Jones, R.G., and Choi, Y. (2009). Enhancing CD8 T Cell Memory by Modulating Fatty Acid Metabolism. Nature *460*, 103–107.

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

Perry, J.M., Harandi, O.F., Porayette, P., Hegde, S., Kannan, A.K., and Paulson, R.F. (2009). Maintenance of the BMP4-dependent stress erythropoiesis pathway in the murine spleen requires hedgehog signaling. Blood *113*, 911–918.

Pimentel, H., Parra, M., Gee, S.L., Mohandas, N., Pachter, L., and Conboy, J.G. (2016). A dynamic intron retention program enriched in RNA processing genes regulates gene expression during terminal erythropoiesis. Nucleic Acids Res. *44*, 838–851.

Pishesha, N., Thiru, P., Shi, J., Eng, J.C., Sankaran, V.G., and Lodish, H.F. (2014). Transcriptional divergence and conservation of human and mouse erythropoiesis. Proc. Natl. Acad. Sci. *111*, 4103–4108.

Plaideau, C., Lai, Y.-C., Kviklyte, S., Zanou, N., Löfgren, L., Andersén, H., Vertommen, D., Gailly, P., Hue, L., Bohlooly-Y, M., et al. (2014). Effects of Pharmacological AMP Deaminase Inhibition and Ampd1 Deletion on Nucleotide Levels and AMPK Activation in Contracting Skeletal Muscle. Chem. Biol. *21*, 1497–1510.

Pollizzi, K.N., Sun, I.-H., Patel, C.H., Lo, Y.-C., Oh, M.-H., Waickman, A.T., Tam, A.J., Blosser, R.L., Wen, J., Delgoffe, G.M., et al. (2016). Asymmetric inheritance of mTORC1 kinase activity during division dictates CD8 T cell differentiation. Nat. Immunol. *17*, 704–711.

Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J.E., Luo, S., Oroz, L.G., Scaravilli, F., Easton, D.F., Duden, R., O'Kane, C.J., et al. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. Nat. Genet. *36*, 585–595.

Reid, M.E., and Mohandas, N. (2004). Red blood cell blood group antigens: structure and function. Semin. Hematol. *41*, 93–117.

Remy, I., Wilson, I.A., and Michnick, S.W. (1999). Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. Science *283*, 990–993.

Ribeil, J.-A., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Cathelin, S., Kersual, J., Dussiot, M., Coulon, S., Moura, I.C., Zeuner, A., Kirkegaard-Sørensen, T., et al. (2007). Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. Nature *445*, 102–105.

Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Kolodziej, K.E., Guyot, B., Heck, A.J.R., Vyas, P., de Boer, E., Grosveld, F., and Strouboulis, J. (2005). GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. EMBO J. *24*, 2354–2366.

Ross, F.A., MacKintosh, C., and Hardie, D.G. (2016). AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours. FEBS J. *283*, 2987–3001.

Salatto, C.T., Miller, R.A., Cameron, K.O., Cokorinos, E., Reyes, A., Ward, J., Calabrese, M.F., Kurumbail, R.G., Rajamohan, F., Kalgutkar, A.S., et al. (2017). Selective Activation of AMPK β1-Containing Isoforms Improves Kidney Function in a Rat Model of Diabetic Nephropathy. J. Pharmacol. Exp. Ther. *361*, 303–311.

Saleque, S., Cameron, S., and Orkin, S.H. (2002). The zinc-finger proto-oncogene Gfi-1b is essential for development of the erythroid and megakaryocytic lineages. Genes Dev. *16*, 301–306.

Salomao, M., Zhang, X., Yang, Y., Lee, S., Hartwig, J.H., Chasis, J.A., Mohandas, N., and An, X. (2008). Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 8026–8031.

Sanchez-Cespedes, M., Parrella, P., Esteller, M., Nomoto, S., Trink, B., Engles, J.M., Westra, W.H., Herman, J.G., and Sidransky, D. (2002). Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. Cancer Res. *62*, 3659–3662.

Sanders, M.J., Ali, Z.S., Hegarty, B.D., Heath, R., Snowden, M.A., and Carling, D. (2007). Defining the Mechanism of Activation of AMP-activated Protein Kinase by the Small Molecule A-769662, a Member of the Thienopyridone Family. J. Biol. Chem. *282*, 32539–32548.

Sandoval, H., Thiagarajan, P., Dasgupta, S.K., Schumacher, A., Prchal, J.T., Chen, M., and Wang, J. (2008). Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. Nature *454*, 232–235.

Sanjuan-Pla, A., Macaulay, I.C., Jensen, C.T., Woll, P.S., Luis, T.C., Mead, A., Moore, S., Carella, C., Matsuoka, S., Bouriez Jones, T., et al. (2013). Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. Nature *502*, 232–236.

Schweers, R.L., Zhang, J., Randall, M.S., Loyd, M.R., Li, W., Dorsey, F.C., Kundu, M., Opferman, J.T., Cleveland, J.L., Miller, J.L., et al. (2007). NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 19500–19505.

Scott, J.W., Hawley, S.A., Green, K.A., Anis, M., Stewart, G., Scullion, G.A., Norman, D.G., and Hardie, D.G. (2004). CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. J. Clin. Invest. *113*, 274–284.

Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. PLOS Biol. *14*, e1002533.

Shintani, T., Mizushima, N., Ogawa, Y., Matsuura, A., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. EMBO J. *18*, 5234–5241.

Shivdasani, R.A., and Orkin, S.H. (1995). Erythropoiesis and globin gene expression in mice lacking the transcription factor NF-E2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 8690–8694.

Shivdasani, R.A., Mayer, E.L., and Orkin, S.H. (1995). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. Nature *373*, 432–434.

Snima, K.S., Pillai, P., Cherian, A.M., Nair, S.V., and Lakshmanan, V.-K. (2014). Anti-diabetic drug metformin: challenges and perspectives for cancer therapy. Curr. Cancer Drug Targets *14*, 727–736.

Socolovsky, M., Fallon, A.E.J., Wang, S., Brugnara, C., and Lodish, H.F. (1999). Fetal Anemia and Apoptosis of Red Cell Progenitors in Stat5a−/−5b−/− Mice: A Direct Role for Stat5 in Bcl-XL Induction. Cell *98*, 181–191.

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.

Stahmann, N., Woods, A., Carling, D., and Heller, R. (2006). Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells via a pathway involving Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. Mol. Cell. Biol. *26*, 5933–5945.

Stamatoyannopoulos, G., Veith, R., Galanello, R., and Papayannopoulou, T. (1985). Hb F production in stressed erythropoiesis: observations and kinetic models. Ann. N. Y. Acad. Sci. *445*, 188–197.

Steinberg, G.R., and Kemp, B.E. (2009). AMPK in Health and Disease. Physiol. Rev. *89*, 1025–1078.

Su, K.-H., Yu, Y.-B., Hou, H.-H., Zhao, J.-F., Kou, Y.R., Cheng, L.-C., Shyue, S.-K., and Lee, T.-S. (2012). AMP-activated protein kinase mediates erythropoietin-induced activation of endothelial nitric oxide synthase. J. Cell. Physiol. *227*, 3053–3062.

Sujobert, P., Poulain, L., Paubelle, E., Zylbersztejn, F., Grenier, A., Lambert, M., Townsend, E.C., Brusq, J.-M., Nicodeme, E., Decrooqc, J., et al. (2015). Co-activation of AMPK and mTORC1 Induces Cytotoxicity in Acute Myeloid Leukemia. Cell Rep. *11*, 1446–1457.

Sun, X., Yang, Q., Rogers, C.J., Du, M., and Zhu, M.-J. (2017). AMPK improves gut epithelial differentiation and barrier function via regulating Cdx2 expression. Cell Death Differ. *24*, 819–831.

Suter, M., Riek, U., Tuerk, R., Schlattner, U., Wallimann, T., and Neumann, D. (2006). Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. J. Biol. Chem. *281*, 32207–32216.

Suzuki, M., Kobayashi-Osaki, M., Tsutsumi, S., Pan, X., Ohmori, S. 'ya, Takai, J., Moriguchi, T., Ohneda, O., Ohneda, K., Shimizu, R., et al. (2013a). GATA factor switching from GATA2 to GATA1 contributes to erythroid differentiation. Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech. *18*.

Suzuki, T., Bridges, D., Nakada, D., Skiniotis, G., Morrison, S.J., Lin, J.D., Saltiel, A.R., and Inoki, K. (2013b). Inhibition of AMPK catabolic action by GSK3. Mol. Cell *50*, 407–419.

Tamás, P., Hawley, S.A., Clarke, R.G., Mustard, K.J., Green, K., Hardie, D.G., and Cantrell, D.A. (2006). Regulation of the energy sensor AMP-activated protein kinase by antigen receptor and Ca2+ in T lymphocytes. J. Exp. Med. *203*, 1665–1670.

Tanida, I., Mizushima, N., Kiyooka, M., Ohsumi, M., Ueno, T., Ohsumi, Y., and Kominami, E. (1999). Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. Mol. Biol. Cell *10*, 1367–1379.

Terszowski, G., Waskow, C., Conradt, P., Lenze, D., Koenigsmann, J., Carstanjen, D., Horak, I., and Rodewald, H.-R. (2005). Prospective isolation and global gene expression analysis of the erythrocyte colony-forming unit (CFU-E). Blood *105*, 1937–1945.

Thali, R.F., Tuerk, R.D., Scholz, R., Yoho-Auchli, Y., Brunisholz, R.A., and Neumann, D. (2010). Novel candidate substrates of AMP-activated protein kinase identified in red blood cell lysates. Biochem. Biophys. Res. Commun. *398*, 296–301.

Tian, W., Li, W., Chen, Y., Yan, Z., Huang, X., Zhuang, H., Zhong, W., Chen, Y., Wu, W., Lin, C., et al. (2015). Phosphorylation of ULK1 by AMPK regulates translocation of ULK1 to mitochondria and mitophagy. FEBS Lett. *589*, 1847–1854.

Ulirsch, J.C., Lacy, J.N., An, X., Mohandas, N., Mikkelsen, T.S., and Sankaran, V.G. (2014). Altered chromatin occupancy of master regulators underlies evolutionary divergence in the transcriptional landscape of erythroid differentiation. PLoS Genet. *10*, e1004890.

Uoshima, N., Ozawa, M., Kimura, S., Tanaka, K., Wada, K., Kobayashi, Y., and Kondo, M. (1995). Changes in c-Kit expression and effects of SCF during differentiation of human erythroid progenitor cells. Br. J. Haematol. *91*, 30–36.

Van Handel, B., Prashad, S.L., Hassanzadeh-Kiabi, N., Huang, A., Magnusson, M., Atanassova, B., Chen, A., Hamalainen, E.I., and Mikkola, H.K.A. (2010). The first trimester human placenta is a site for terminal maturation of primitive erythroid cells. Blood *116*, 3321–3330.

Vandekerckhove, J., Ribeil, J.-A., Zermati, Y., Garrido, C., Courtois, G., Solary, E., and Hermine, O. (2008). Hsp70, l'ange gardien de GATA-1 lors de la différenciation des globules rouges. médecine/sciences *24*, 37–40.

Verbist, K.C., Guy, C.S., Milasta, S., Liedmann, S., Kamiński, M.M., Wang, R., and Green, D.R. (2016). Metabolic maintenance of cell asymmetry following division in activated T lymphocytes. Nature *532*, 389–393.

Viana, R., Towler, M.C., Pan, D.A., Carling, D., Viollet, B., Hardie, D.G., and Sanz, P. (2007). A conserved sequence immediately N-terminal to the Bateman domains in AMP-activated protein kinase gamma subunits is required for the interaction with the beta subunits. J. Biol. Chem. *282*, 16117–16125.

Wang, M., and Unger, R.H. (2005). Role of PP2C in cardiac lipid accumulation in obese rodents and its prevention by troglitazone. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *288*, E216-221.

Wang, C.C., Tao, M., Wei, T., and Low, P.S. (1997). Identification of the major casein kinase I phosphorylation sites on erythrocyte band 3. Blood *89*, 3019–3024.

Wang, J., Fang, Y., Yan, L., Yuan, N., Zhang, S., Xu, L., Nie, M., Zhang, X., and Wang, J. (2016a). Erythroleukemia cells acquire an alternative mitophagy capability. Sci. Rep. *6*, 24641.

Wang, L., Teng, R., Di, L., Rogers, H., Wu, H., Kopp, J.B., and Noguchi, C.T. (2013a). PPARα and Sirt1 mediate erythropoietin action in increasing metabolic activity and browning of white adipocytes to protect against obesity and metabolic disorders. Diabetes *62*, 4122–4131.

Wang, L., Jia, Y., Rogers, H., Suzuki, N., Gassmann, M., Wang, Q., McPherron, A.C., Kopp, J.B., Yamamoto, M., and Noguchi, C.T. (2013b). Erythropoietin contributes to slow oxidative muscle fiber specification via PGC-1α and AMPK activation. Int. J. Biochem. Cell Biol. *45*, 1155–1164.

Wang, S., Dale, G.L., Song, P., Viollet, B., and Zou, M.-H. (2010a). AMPKalpha1 deletion shortens erythrocyte life span in mice: role of oxidative stress. J. Biol. Chem. *285*, 19976–19985.

Wang, S., Dale, G.L., Song, P., Viollet, B., and Zou, M.-H. (2010b). AMPKalpha1 deletion shortens erythrocyte life span in mice: role of oxidative stress. J. Biol. Chem. *285*, 19976–19985.

Wang, Z., Wang, N., Liu, P., and Xie, X. (2016b). AMPK and Cancer. EXS *107*, 203–226.

Warden, S.M., Richardson, C., O'Donnell, J., Stapleton, D., Kemp, B.E., and Witters, L.A. (2001). Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. Biochem. J. *354*, 275–283.

Williams, T., and Brenman, J.E. (2008). LKB1 and AMPK in cell polarity and division. Trends Cell Biol. *18*, 193–198.

Williamson, D.L., Butler, D.C., and Alway, S.E. (2009). AMPK inhibits myoblast differentiation through a PGC-1alpha-dependent mechanism. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *297*, E304-314.

Willows, R., Sanders, M.J., Xiao, B., Patel, B.R., Martin, S.R., Read, J., Wilson, J.R., Hubbard, J., Gamblin, S.J., and Carling, D. (2017). Phosphorylation of AMPK by upstream kinases is required for activity in mammalian cells. Biochem. J. *474*, 3059–3073.

Wingo, S.N., Gallardo, T.D., Akbay, E.A., Liang, M.-C., Contreras, C.M., Boren, T., Shimamura, T., Miller, D.S., Sharpless, N.E., Bardeesy, N., et al. (2009). Somatic LKB1 mutations promote cervical cancer progression. PloS One *4*, e5137.

Woods, A., Johnstone, S.R., Dickerson, K., Leiper, F.C., Fryer, L.G.D., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., and Carling, D. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. Curr. Biol. CB *13*, 2004–2008.

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.

Wu, N., Zheng, B., Shaywitz, A., Dagon, Y., Tower, C., Bellinger, G., Shen, C.-H., Wen, J., Asara, J., McGraw, T.E., et al. (2013). AMPK-Dependent Degradation of TXNIP upon Energy Stress Leads to Enhanced Glucose Uptake via GLUT1. Mol. Cell *49*, 1167–1175.

Wu, Y., Song, P., Xu, J., Zhang, M., and Zou, M.-H. (2007). Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. J. Biol. Chem. *282*, 9777–9788.

Xiang, J., Wu, D.-C., Chen, Y., and Paulson, R.F. (2015). In vitro culture of stress erythroid progenitors identifies distinct progenitor populations and analogous human progenitors. Blood *125*, 1803–1812.

Xiao, B., Heath, R., Saiu, P., Leiper, F.C., Leone, P., Jing, C., Walker, P.A., Haire, L., Eccleston, J.F., Davis, C.T., et al. (2007). Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. Nature *449*, 496–500.

Xiao, B., Sanders, M.J., Underwood, E., Heath, R., Mayer, F.V., Carmena, D., Jing, C., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Haire, L.F., et al. (2011). Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. Nature *472*, 230–233.

Xiao, B., Sanders, M.J., Carmena, D., Bright, N.J., Haire, L.F., Underwood, E., Patel, B.R., Heath, R.B., Walker, P.A., Hallen, S., et al. (2013). Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. Nat. Commun. *4*, ncomms4017.

Yam, C.H., Fung, T.K., and Poon, R.Y.C. (2002). Cyclin A in cell cycle control and cancer. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *59*, 1317–1326.

Yamamoto, R., Morita, Y., Ooehara, J., Hamanaka, S., Onodera, M., Rudolph, K.L., Ema, H., and Nakauchi, H. (2013). Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. Cell *154*, 1112–1126.

Yoshida, H., Kawane, K., Koike, M., Mori, Y., Uchiyama, Y., and Nagata, S. (2005). Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. Nature *437*, 754–758.

Zadra, G., Photopoulos, C., Tyekucheva, S., Heidari, P., Weng, Q.P., Fedele, G., Liu, H., Scaglia, N., Priolo, C., Sicinska, E., et al. (2014). A novel direct activator of AMPK inhibits prostate cancer growth by blocking lipogenesis. EMBO Mol. Med. *6*, 519–538.

Zelenak, C., Föller, M., Velic, A., Krug, K., Qadri, S.M., Viollet, B., Lang, F., and Macek, B. (2011). Proteome analysis of erythrocytes lacking AMP-activated protein kinase reveals a role of PAK2 kinase in eryptosis. J. Proteome Res. *10*, 1690–1697.

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.

Zhang, X., Campreciós, G., Rimmelé, P., Liang, R., Yalcin, S., Mungamuri, S.K., Barminko, J., D'Escamard, V., Baron, M.H., Brugnara, C., et al. (2014). FOXO3-mTOR metabolic cooperation in the regulation of erythroid cell maturation and homeostasis. Am. J. Hematol. *89*, 954–963.

Zhou, J., Huang, W., Tao, R., Ibaragi, S., Lan, F., Ido, Y., Wu, X., Alekseyev, Y.O., Lenburg, M.E., Hu, G.–., et al. (2009). Inactivation of AMPK alters gene expression and promotes growth of prostate cancer cells. Oncogene *28*, 1993–2002.

Zhu, H., Foretz, M., Xie, Z., Zhang, M., Zhu, Z., Xing, J., Leclerc, J., Gaudry, M., Viollet, B., and Zou, M.-H. (2014). PRKAA1/AMPKα1 is required for autophagy-dependent mitochondrial clearance during erythrocyte maturation. Autophagy *10*, 1522–1534.

Annexes

Regulation of cell surface transferrin receptor-2 by iron-dependent cleavage and release of a soluble form

Alessia Pagani,[1,2] Maud Vieillevoye,[3,4] Antonella Nai,[1,2] Marco Rausa,[1,2] Meriem Ladli,[3,4] Catherine Lacombe,[3,4] Patrick Mayeux,[3,4] *Frédérique Verdier,[3,4] *Clara Camaschella,[1,2] and *Laura Silvestri[1,2]

[1]Vita Salute San Raffaele University, Milan, Italy; [2]Division of Genetics and Cell Biology, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy; [3]Institut Cochin, INSERM, U1016, Université Paris Descartes, CNRS (UMR8104), Paris, France; and [4]Ligue National contre le Cancer, Paris, France

ABSTRACT

Transferrin receptor-2 is a transmembrane protein whose expression is restricted to hepatocytes and erythroid cells. Transferrin receptor-2 has a regulatory function in iron homeostasis, since its inactivation causes systemic iron overload. Hepatic transferrin receptor-2 participates in iron sensing and is involved in hepcidin activation, although the mechanism remains unclear. Erythroid transferrin receptor-2 associates with and stabilizes erythropoietin receptors on the erythroblast surface and is essential to control erythrocyte production in iron deficiency. We identified a soluble form of transferrin receptor-2 in the media of transfected cells and showed that cultured human erythroid cells release an endogenous soluble form. Soluble transferrin receptor-2 originates from a cleavage of the cell surface protein, which is inhibited by diferric transferrin in a dose-dependent manner. Accordingly, the shedding of the transferrin receptor-2 variant G679A, mutated in the Arginine-Glycine-Aspartic acid motif and unable to bind diferric transferrin, is not modulated by the ligand. This observation links the process of transferrin receptor-2 removal from the plasma membrane to iron homeostasis. Soluble transferrin receptor-2 does not affect the binding of erythropoietin to erythropoietin receptor or the consequent signaling and partially inhibits hepcidin promoter activation only *in vitro*. Whether it is a component of the signals released by erythropoiesis in iron deficiency remains to be investigated. Our results indicate that membrane transferrin receptor-2, a sensor of circulating iron, is released from the cell membrane in iron deficiency.

Introduction

Transferrin receptor-2 (TFR2) is a type II transmembrane glycoprotein homologous to TFR1,[1] able to bind diferric-transferrin (holo-TF), although with lower affinity than TFR1. In iron homeostasis TFR2 appears to have regulatory rather than transport functions, since *TFR2* mutations in humans[2] and *Tfr2* inactivation in mice[3-5] cause iron overload with low hepcidin.[6] *TFR2* is mainly expressed in the liver[1,7] where it is essential for hepcidin control. Its expression is up-regulated during hepatic development but is not modulated by iron; indeed *TFR2* mRNA has no detectable iron-responsive elements in its untranslated regions.[8]

TFR2 encodes an 801 amino acid protein with a short cytosolic tail that contains a potential internalization signal, a transmembrane domain and a large C-terminal ectodomain. This last has a protease-associated domain, a peptidase M28-like domain and a dimerization domain with two RGD motifs, important for protein-protein interactions and for transferrin binding. Mutations of *TFR2* cause type 3 hemochromatosis: all reported mutations[2] are rare, often private. Mutations cause loss of function and include frameshift, premature stop, small deletions and missense mutations prevalently affecting the protein C-terminus, especially the peptidase-like and the dimerization domains.[9]

Binding to holo-TF stabilizes TFR2 on the cell surface[10] and this interaction redirects TFR2 towards the recycling instead of the lysosomal degradation pathway.[4] Experiments in cultured hepatoma cell lines suggest that TFR2, bound to holo-TF, may simultaneously bind HFE. While the HFE- and the TF-binding sites on TFR1 overlap, in TFR2 they are different.[10,11] The HFE-TFR2 complex has been proposed to act as a sensor of circulating iron and as an activator of hepcidin expression.[12] However, recent data suggest that the two proteins may have separate functions and their interaction is also controversial.[13] Iron overload is more severe in *Tfr2*$^{-/-}$ than in *Hfe*$^{-/-}$ mice and *Tfr2-Hfe* double knock-out mice show the most severe disease.[14] Studies in patients indicate that TFR2 plays a prominent and HFE a minor role in hepcidin activation in response to an acute increase of transferrin saturation after a single dose of oral iron.[15] As a further level of complexity, the *TFR2* gene, which has two consensus sequences for the erythroid transcription factor GATA-1 in its promoter,[12] is expressed in immature erythroid cells[16] where it is a component of the erythropoietin receptor (EPOR) complex.[17] The TFR2-EPOR association is required for the efficient transport of EPOR to the cell surface. Although neither *TFR2*-hemochromatosis patients nor *Tfr2*$^{-/-}$ mice have evident hematologic abnormalities, the erythroid progenitors from *Tfr2*$^{-/-}$ young mice appear less sensitive to erythropoietin (EPO) and have increased serum Epo levels. Moreover, *TFR2* silencing in human erythroid progenitors delays their terminal differentiation.[17]

TFR1 sheds a soluble counterpart (sTFR1), *in vitro* and *in vivo*, which is measurable in serum from normal individuals.[18]

©2015 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper. doi:10.3324/haematol.2014.118521
The online version of this article has a Supplementary Appendix.
Manuscript received on October 2, 2014. Manuscript accepted on January 28, 2015.
Correspondence: silvestri.laura@hsr.it

TFR1 is highly expressed on the surface of maturing erythroblasts and, when unbound to holo-TF, is released into plasma in high concentrations. This process occurs in iron deficiency anemia, in erythropoiesis expansion and in some hematologic malignancies.[19] In contrast, sTFR1 levels are reduced in aplastic and hypoproliferative anemias. Although its function remains unexplained, sTFR1 has been proposed as a marker of iron deficiency and/or of total erythropoietic activity. The shedding of sTFR1 is regulated by its ligand holo-TF and, as recently shown, is mediated by the proprotein convertase subtilisin/kexin type 7 (PCSK7).[20] Interestingly, *PCSK7* genetic variants are associated with sTFR1 quantitative trait in genome-wide association studies.[21]

Here we characterize a previously unrecognized soluble form of TFR2 (sTFR2) that is shed from the plasma membrane both in transfected cell lines and in TFR2-expressing erythroid cells. We show that the process of TFR2 release is regulated by the ligand holo-TF, a regulation lost in a TFR2 mutant ($TFR2^{G679A}$) unable to bind the ligand. Because of its low affinity for holo-TF, we suggest that the shedding of TFR2 signals iron deficiency simultaneously in hepatic and erythroid cells.

Methods

Wild-type and mutant constructs

A *TFR2* wild-type cDNA was cloned in pCMV-TAG4 vector with a FLAG-tag at the C-terminus ($TFR2^{WT\text{-}C\text{-}FLAG}$). *TFR2* wild-type ($TFR2^{WT\text{-}N\text{-}FLAG}$) and $TFR2^{G679A}$ constructs in pcDNA3.1(+) have a FLAG-tag at the N-terminus. A "soluble" artificial isoform of TFR2 (sTFR2*) was generated by amplification of the coding region from nucleotide 313 (Arg105) to nucleotide 2403 (Phe801) and in-frame-cloned in pSEC-TAG (B), with a MYC-HIS-tag at the C-terminus, using the following oligonucleotides:

sTFR2-KpnI-fw: 5'-GGGGTACCCGAGGGTCCTGCCAGGCG-3'

sTFR2-EcoRI-rev: 5'-GGAATTCCAGAAGTTGTTATCAAT-GTTCC-3'

Mammalian expressing vectors encoding for wild-type dynamin (Dyn^{WT}) and the dominant negative variant Dyn^{K44A} are described elsewhere.[22] Hemojuvelin (HJV)-expressing vector and the hepcidin promoter luciferase reporter construct (Hep-Luc) were as described previously.[23] *FURIN* and *PCSK7* expressing vectors are described in the *Online Supplementary Methods*.

Cell culture and reagents

HeLa, HEK293, CHO-Trvb-0, the erythroleukemic cell line UT7 and the hepatoma cell lines HuH7 and Hep3B, culture conditions and reagents are described in the *Online Supplementary Methods*.

$CD34^+$ cells were obtained from human donors who gave informed consent in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki . Approval for their use was obtained from the La Pitié-Salpétrière Hospital Institutional Ethic Committee. $CD34^+$cells were purified from the peripheral blood after cytapheresis. $CD34^+$ and $CD36^+$ cells were isolated by positive selection as described in the *Online Supplementary Methods*. $CD36^+$ cells were cultured in the presence of 2 U/mL EPO, 100 ng/mL stem cell factor and 10 ng/mL interleukin-3 for up to 12 days for erythroid differentiation.

When indicated, cells were treated with different concentrations (0.5, 1.25, 5 and 25 μM) of human or bovine diferric-transferrin (H-holo-TF and B-holo-TF, respectively) and human apo-transferrin (apo-TF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in serum-free media; erythroid cells were treated with 25 μM of human apo-TF or holo-TF.

Brefeldin-A (Sigma-Aldrich), a fungal antibiotic that alters intracellular trafficking by blocking protein maturation across the post-endoplasmic reticulum compartment, was used at a concentration of 100-500 ng/mL.

Procedures for pull-down of membrane and soluble TFR2, western blot analysis of conditioned cell culture media and total cell lysates, and the luciferase reporter assay for the effect of sTFR2 on the hepcidin promoter are described in the *Online Supplementary Methods*.

Scatchard analysis

UT-7 cells were suspended in binding medium (alpha-MEM containing 20 mM Hepes, 10% fetal calf serum, 0.1% sodium azide, pH 7.2). Twenty-five microliters of the cell suspension, containing $4x10^6$ cells, were incubated with 25 μL of conditioned medium from HEK293 cells transfected with the empty or sTFR2* expressing vectors. Samples were equilibrated at 37°C for 60 min. Twenty-five microliters of binding medium alone or 25 μL of a 100-fold excess of unlabeled EPO were added to the binding assay. Then the chosen amount of ^{125}I-EPO was added in a volume of 25 μL and the cells were incubated for a further 30 min at 37°C. The content of each well was carefully layered over 900 μL of a cold solution of phosphate-buffered saline and centrifuged at 4°C for 10 min at 600 g. Unbound radioactivity was counted and after three washes in phosphate-buffered saline, cell-bound radioactivity was counted in the pellet. The non-specific binding of ^{125}I-EPO, determined by adding a 100-fold excess of unlabeled EPO to the binding assay, was subtracted from the total binding to give the specific binding.

Two independent experiments were performed using two different batches of ^{125}I-EPO and control conditioned medium or sTFR2*-containing conditioned medium from two independent experiments.

Results

Identification of a soluble form of transferrin receptor-2

To study the cell localization and processing of TFR2, HeLa cells, which do not express endogenous TFR2 (*data not shown*), were transiently transfected with an expressing vector that encodes for a N-FLAG tagged form of TFR2 ($TFR2^{WT\text{-}N\text{-}FLAG}$). Since TFR1 and other iron-related proteins present on the cell membrane release soluble forms, we investigated whether this would also occur with TFR2. In the media of TFR2 transfected cells we identified a single band (sTFR2) of about 80 kDa, which migrated faster than the cell-associated isoforms, suggesting that it was the result of a cleavage mechanism. Since sTFR2 can be detected using an anti-TFR2 antibody, recognizing residues from amino acid 150 to 250, but not with the anti-FLAG antibody when using an N-terminal flagged construct, we concluded that the cleavage occurs at the N-terminal part of the protein, close to the transmembrane domain, as occurs for sTFR1.[24] To confirm this finding, sTFR2 from cells transfected with $TFR2^{WT\text{-}C\text{-}FLAG}$, which has a FLAG-tag at the C-terminus, was indeed detected with the anti-FLAG antibody (Figure 1A). The size of sTFR2 is compatible with that of a protein lacking intracellular and transmembrane regions. Indeed the artificial form of sTFR2 (sTFR2*), generated by cloning the TFR2 ectodomain (amino acids 105-801) downstream of the Ig k-chain leader sequence, migrates as the isoform shed from the full length TFR2 transfected cells (Figure 1A).

sTFR2 is not an artefact due to cDNA overexpression since it is also released by TFR2-expressing cells, such as the erythroleukemic cell line UT7 and human primary erythroblasts. Both UT7 cells and primary erythroblasts release a band of sTFR2 of approximately 80 kDa in culture media (Figure 1B), compatible with the size of sTFR2 released by TFR2-transfected cells. In the total lysates of erythroid cells, TFR2 migrates as a doublet of about 102 and 92 kDa, as previously observed.[17]

Soluble transferrin receptor-2 is shed from the plasma membrane

It was previously reported that the receptor exposed on the cell surface is stabilized in the presence of holo-TF with a maximum effect at 25 μM holo-TF.[10] We confirmed the same stabilization both in transfected cells and in TFR2-competent cells. HeLa cells transfected with *TFR2*$^{WT\text{-}C\text{-}FLAG}$ construct were treated with human holo-TF and apo-TF (25 μM) in serum-free media and were biotinylated to label membrane proteins. sTFR2 was pulled-down using anti-FLAG Sepharose-beads to avoid holo-TF interference with gel migration of concentrated culture media. In these conditions, as a consequence of holo-TF treatment, we observed a reduction of sTFR2, mirrored by an increase in membrane-exposed TFR2 (Figure 2A).

A substantial increase in the expression of membrane TFR2 was also detected in biotinylated plasma membranes from erythroid UT7 cells and primary erythroblasts when cultured in the presence of holo-TF, while endogenous sTFR2 production was decreased (Figure 2B). This confirms that the inverse regulation of membrane and soluble TFR2 in the presence of the ligand is also maintained in cells expressing endogenous TFR2 (Figure 2A).

We asked whether sTFR2 originates from the plasma membrane or is released during receptor internalization. To this aim cell surface proteins were labeled using a cell-impermeable biotin and were treated with holo-TF. sTFR2 was detected in the culture media of transfected cells after streptavidin pull-down of biotin-labeled proteins, demonstrating that it originates from membrane-exposed TFR2 (*Online Supplementary Figure S1B*).

To further prove the membrane origin of sTFR2, we treated HeLa cells with brefeldin-A, a fungal antibiotic that alters intracellular trafficking by blocking protein maturation across the post-endoplasmic reticulum compartment.[25] Brefeldin-A induced a strong reduction of both membrane-associated and soluble TFR2 (Figure 2C), consistent with the finding that TFR2 is shed from the cell surface.

To investigate the potential contribution of endocytosis to the release of sTFR2, we exploited the effect of dynamin dead-mutant K44A (Dyn^{K44A}), which blocks the endocytosis process, thus "fixing" the proteins on the cell surface.[26] The amount of sTFR2 in cells transfected with Dyn^{K44A} was strongly increased compared to that of cells transfected with wild-type dynamin (Dyn^{WT}), further strengthening the belief that the cleavage occurs at the cell surface (Figure 2D). Under these conditions, holo-TF was still able to reduce the shedding process (Figure 2E).

Transferrin receptor-2 shedding is inhibited by holo-transferrin in a dose-dependent manner

TFR2 can bind holo-TF and is highly homologous to TFR1 and the release of sTFR1 is reduced by its ligand.[27] For these reasons we investigated whether sTFR2 release was affected by holo-TF in our *in vitro* system. HuH7 (Figure 3A) and HeLa (*Online Supplementary Figure S1B,C*) cells were transiently transfected with the *TFR2*-expressing vector and then treated with increasing concentrations of human holo-

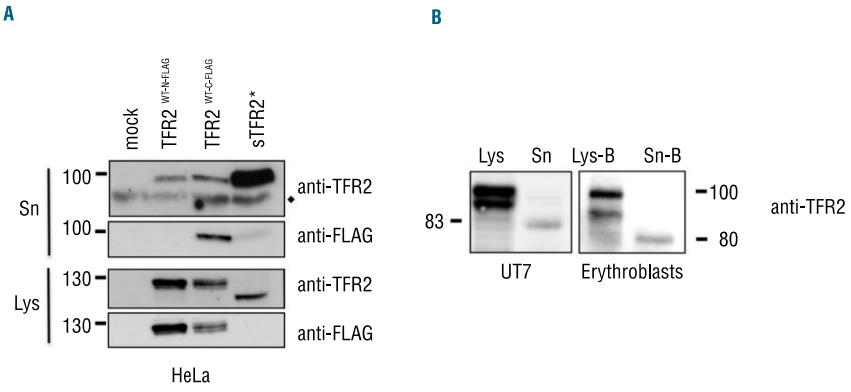


Figure 1. Identification of a soluble form of TFR2 (sTFR2). (A) HeLa cells were transiently transfected with empty vector (mock), wild-type *TFR2* FLAG-tagged at the N-terminus (TFR2$^{WT\text{-}N\text{-}FLAG}$), wild-type *TFR2* FLAG-tagged at the C-terminus (TFR2$^{WT\text{-}C\text{-}FLAG}$) and the artificial sTFR2 (sTFR2*) expressing vectors. Media were replaced 18 h after transfection with serum-free media. Twenty-four hours later media were collected and concentrated and cells were lysed. Fifty micrograms of proteins from supernatants and cellular lysates were analyzed by western blot, using anti-TFR2 (Abcam) and anti-FLAG antibodies. ♦ = non-specific bands. (B) TFR2 from cell lysates and sTFR2 from supernatant were detected by western blot with an antibody recognizing the C-terminal part of TFR2 (Santa Cruz). Endogenous expression of TFR2 and sTFR2 is shown in UT7 cells (left) and in primary erythroblasts (right). Because human primary erythroblasts cannot survive in albumin-free medium, a cell surface biotinylation technique was used to purify sTFR2 from the supernatant. Lys: total cell lysate, Lys-B: cell lysate pull-down with neutravidin agarose beads, Sn: concentrated media, Sn-B: concentrated media pull-down with neutravidin agarose beads. Scales refer to relative molecular mass in kilo Daltons.

TF. To avoid holo-TF interference with gel migration of concentrated culture media, we biotinylated cell surface proteins and pulled-down sTFR2 in the supernatants using streptavidin beads. As shown in Figure 3A, human holo-TF inhibited the release of sTFR2 in a dose-dependent manner. This inhibition was not mediated by iron, since treatment of TFR2-transfected cells with iron donors (ferric ammonium citrate) or iron chelators (deferoxamine) did not modulate sTFR2 concentration in the culture media (*Online Supplementary Figure S1A*).

To understand whether the observed inhibition was a direct effect of the ligand binding, we used TFR2^{C679A}, an artificial variant unable to bind holo-TF since the mutation inactivates the RGD binding domain.[28] As shown in Figure 3B, TFR2^{C679A} released sTFR2 in high concentrations and the process was not modulated by the ligand.

Shedding of transferrin receptor-2 occurs independently of transferrin receptor-1

To exclude that sTFR2 release might be influenced by binding of holo-TF to its high affinity receptor TFR1 we used two approaches. First, we used bovine holo-TF, which specifically binds TFR2 but is unable to bind human TFR1.[28] As with human holo-TF, sTFR2 was strongly decreased in the presence of bovine holo-TF both in HeLa cells (Figure 4A) and in HuH7 cells (*data not shown*). Second, we analyzed the shedding process in *TFR2*-transfected CHO-Trvb-0 cells that lack TFR1.[29] We confirmed that these cells did not

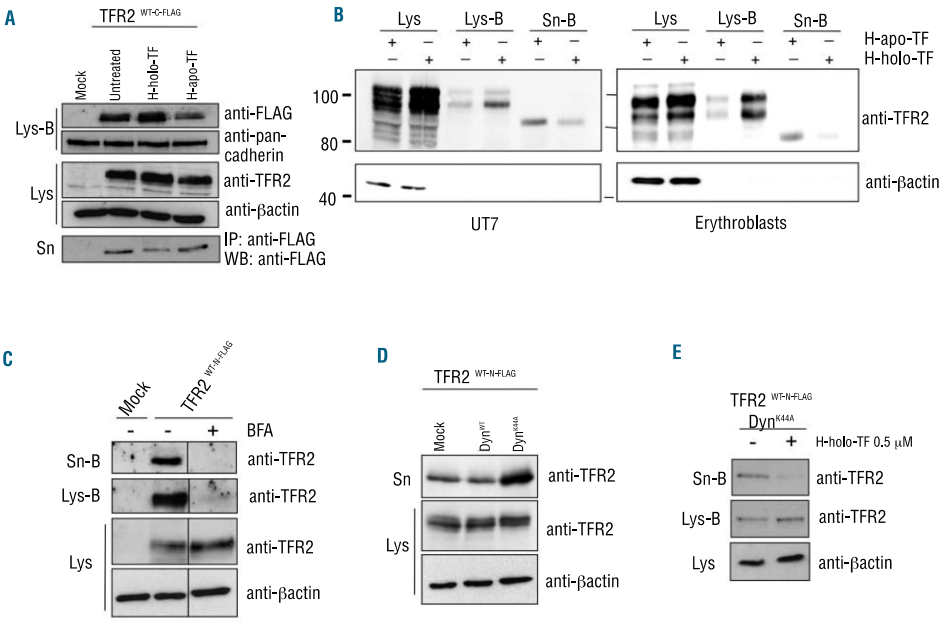


Figure 2. sTFR2 is cleaved from the plasma membrane. (A) HeLa cells were transiently transfected with empty vector (mock) and *TFR2*$^{WT\text{-}C\text{-}FLAG}$ coding vector. Eighteen hours after transfection the media were replaced with serum-free media to which human holo-transferrin (H-holo-TF, 25 μM) or human apo-transferrin (H-apo-TF, 25 μM) was added or not. After 24 h media were collected and concentrated, cells were biotinylated to label membrane protein then lysed. sTFR2 was pulled down using anti-FLAG Sepharose-beads. Cellular lysates were precipitated with streptavidin to analyze proteins originating from the cell surface. Total lysates (Lys), biotinylated samples (Lys-B) and concentrated media (Sn) were analyzed by western blot using anti-TFR2 (Abcam), anti-FLAG antibody. Anti-pan-cadherin, which recognizes a plasma membrane protein, was used to normalize plasma membrane biotinylation and streptavidin pull-down. (B) An erythroid cell line UT7 (left panel) and erythroblasts (right panel) were incubated for 24 h in the presence of 25 μM human apo-TF or holo-TF. After biotinylation of cell surface proteins, cell lysates (Lys-B) and supernatant (Sn-B) were precipitated using neutravidin agarose beads. Western blots were performed using an anti-TFR2 antibody (Santa Cruz). Scales refer to relative molecular mass in kilo Daltons. (C) HeLa cells transiently transfected with empty vector (mock) and wild-type *TFR2* coding vector (TFR2$^{WT\text{-}N\text{-}FLAG}$) were treated with brefeldin-A (BFA, 100 ng/mL) to block intracellular trafficking and protein export to the plasma membrane. After 18 h cells were incubated with biotin to label membrane proteins and than re-incubated with BFA. Twenty-four hours later media were collected and concentrated, cells lysed (Lys) and both media (Sn-B) and lysates (Lys-B) were subjected to streptavidin pull-down and western blot analysis using an anti-TFR2 antibody (Abcam). (D) The cell culture media and the total lysates of HeLa cells, transiently transfected with wild type *TFR2* (TFR2$^{WT\text{-}N\text{-}FLAG}$) in combination with Dyn^{WT} and Dyn^{K44A} expressing vectors, were analyzed by western blot using anti-TFR2 (Abcam). (E) HeLa cells were transiently transfected with wild-type *TFR2* (TFR2$^{WT\text{-}N\text{-}FLAG}$) and Dyn^{K44A} expressing vectors. After 18 h cells were incubated with biotin to label membrane proteins and were incubated in serum-free media, treated or not with H-holo-TF (0.5 μM). After 24 h media were collected and concentrated and cells were lysed. Both media (Sn-B) and lysates (Lys-B) were precipitated with streptavidin to analyze by western blot proteins originating from the cell surface using an anti-TFR2 antibody (Abcam). Loading was estimated with anti-β-actin antibody. The results were confirmed several times in different experiments. Western blots of representative experiments are shown.

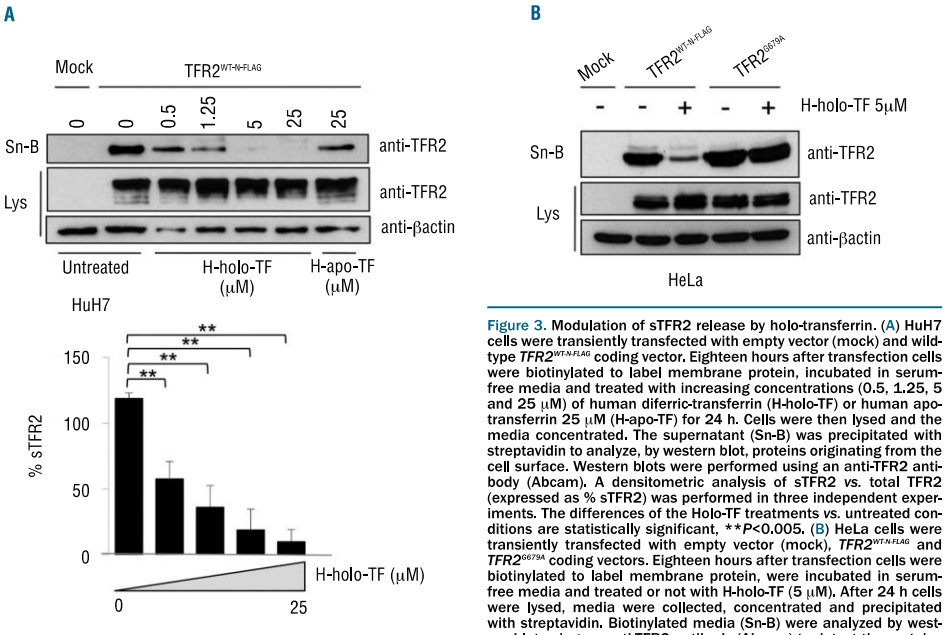


Figure 3. Modulation of sTFR2 release by holo-transferrin. (A) HuH7 cells were transiently transfected with empty vector (mock) and wild-type *TFR2*$^{WT\text{-}N\text{-}FLAG}$ coding vector. Eighteen hours after transfection cells were biotinylated to label membrane protein, incubated in serum-free media and treated with increasing concentrations (0.5, 1.25, 5 and 25 μM) of human diferric-transferrin (H-holo-TF) or human apo-transferrin 25 μM (H-apo-TF) for 24 h. Cells were then lysed and the media concentrated. The supernatant (Sn-B) was precipitated with streptavidin to analyze, by western blot, proteins originating from the cell surface. Western blots were performed using an anti-TFR2 antibody (Abcam). A densitometric analysis of sTFR2 *vs.* total TFR2 (expressed as % sTFR2) was performed in three independent experiments. The differences of the Holo-TF treatments *vs.* untreated conditions are statistically significant, $^{**}P<0.005$. (B) HeLa cells were transiently transfected with empty vector (mock), *TFR2*$^{WT\text{-}N\text{-}FLAG}$ and *TFR2*^{G679A} coding vectors. Eighteen hours after transfection cells were biotinylated to label membrane protein, were incubated in serum-free media and treated or not with H-holo-TF (5 μM). After 24 h cells were lysed, media were collected, concentrated and precipitated with streptavidin. Biotinylated media (Sn-B) were analyzed by western blot using an anti-TFR2 antibody (Abcam) to detect the proteins deriving from the cell surface. Lys: total lysates. Loading was estimated with anti-β-actin antibody. The results were confirmed several times in different experiments and representative western blots are shown.

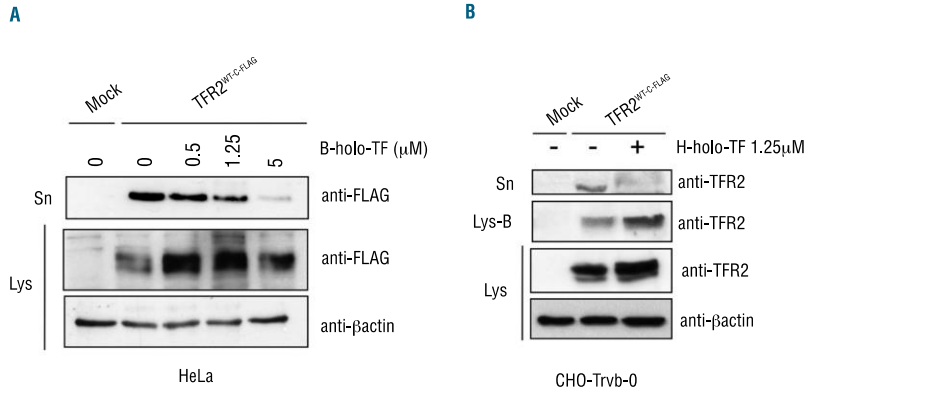


Figure 4. TFR2 shedding is independent of TFR1. (A) HeLa cells were transiently transfected with empty vector (mock) or *TFR2*$^{WT\text{-}C\text{-}FLAG}$ vector. Eighteen hours after transfection media were replaced with serum-free media and cells were treated or not for 24 h with increasing concentrations (0.5, 1.25, 5 μM) of bovine holo-transferrin (B-holo-TF), a ligand specific for TFR2 that does not bind TFR1. Media were collected, concentrated and sTFR2 was pulled down using Sepharose-beads anti-FLAG. Immunoprecipitated proteins were analyzed by western blot using the anti-FLAG antibody. The results were confirmed in three independent experiments and western blot of a representative one is shown. (B) CHO-Trvb-0 (TFR1 deficient) cells were transiently transfected with empty vector (mock) and *TFR2*$^{WT\text{-}C\text{-}FLAG}$ coding vector. Media were replaced 18 h after transfection with serum-free media containing or not 1.25 μM of human holo-TF (H-holo-TF), and surface proteins were biotinylated. Media were collected, concentrated and analyzed by western blot using anti-TFR2 antibody (Abcam). Sn= concentrated media; Lys= total cell lysate, Lys-B = cell lysate pull down with streptavidin-agarose beads. Loading was estimated with anti-β-actin antibody.

express TFR1 (*Online Supplementary Figure S2*) and we showed that also in these cells holo-TF inhibited the release of sTFR2 and stabilized TFR2 on the cell surface (Figure 4B).

Overall our results demonstrate that the shedding of TFR2 does not require TFR1 and that the inhibition of sTFR2 release results directly from ligand-receptor binding.

Soluble transferrin receptor-2 does not affect erythropoietin receptor expression or erythropoietin binding in erythroid cells and mildly reduces hepcidin promoter activation in hepatoma cells

Because the TFR2-EPOR association is required for efficient transport of EPOR to the cell surface,[17] we studied whether sTFR2 could modify the number of cell surface EPOR or the affinity of EPO for its receptor by Scatchard analysis in UT7 cells. To investigate this issue, we used sTFR2*, which is functional (see below) and more efficiently produced than the naturally cleaved TFR2 (Figure 1A). The conditioned medium of HEK293 cells transfected with sTFR2* (Sn sTFR2*) or with empty vector (Sn mock) did not significantly modify the number of EPOR expressed on the cell surface or the affinity for its ligand (Figure 5A). However, brefeldin-A treatment decreased the number of EPOR on the plasma membrane (*Online Supplementary Figure S3*). To investigate the activation of EPO-mediated intracellular signaling, the phosphorylation status of STAT5, AKT and ERK, major targets of this pathway, was assessed in UT7 cells treated or not with sTFR2*. As illustrated in Figure 5B and quantified in Figure 5C, EPO signaling was not significantly affected by sTFR2*. These data were supported by the observation that exogenous sTFR2* did not interact with EPOR when added to the culture medium (*Online Supplementary Figure S4*).

To evaluate the functional role of sTFR2 in the hepatic

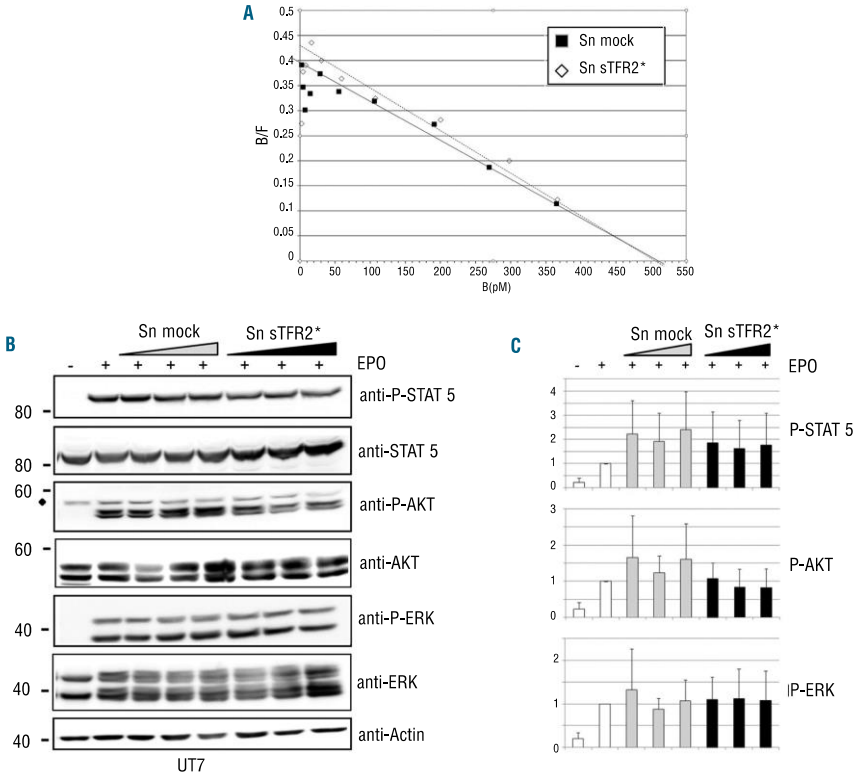


Figure 5. Effect of sTFR2 in erythroid cells. (A) Scatchard analysis of ^{125}I erythropoietin (EPO) binding to UT7 cells in the presence of conditioned media from sTFR2* (Sn sTFR2*) or empty vectors (Sn mock) transfected HEK293 cells. (B) Growth factor-deprived UT-7 cells were pre-incubated for 1 h at 37°C with concentrated media from HEK293 cells transfected with empty vector (Sn mock) or sTFR2* (Sn sTFR2*). The cells were then stimulated with 10 U/mL EPO for 10 min. Media were concentrated and increasing concentrations of media were added to the UT7 cells. Cellular extracts were analyzed by western blot with anti-p-STAT5, anti-p-AKT and anti-p-ERK antibodies. Anti-STAT5, anti-AKT, anti-ERK were used as loading controls. One representative western blot is shown. ♦= non-specific band. (C) Western blot quantification with anti-β-actin antibody: values are the means of three independent experiments ±SD.

compartment, we studied the modulation of the hepcidin promoter in HuH7 cells treated with the conditioned medium of the same hepatoma-derived cells transfected with $TFR2^{WT\text{-}N\text{-}FLAG}$. The supernatant of TFR2-transfected cells (Sn TFR2) mildly reduced hepcidin activation both in basal conditions and in the presence of the BMP co-receptor HJV (*Online Supplementary Figure S5A*). The artificial sTFR2* showed a similar activity when transfected in HuH7 and Hep3B cells, decreasing HJV-dependent hepcidin activation in a dose-dependent manner (*Online Supplementary Figure S5B,C*).

To analyze whether sTFR2 could interfere with BMP signaling we studied the response of the hepcidin promoter in Hep3B cells in the presence of both sTFR2* and BMP6 and we confirmed the same partial inhibitory effect observed both in basal and in HJV-mediated hepcidin activation (*Online Supplementary Figure S5D*). However, an effect of sTFR2 on the hepcidin promoter assay was observed only *in vitro*.

Discussion

From its discovery more than 10 years ago[1] and its identification as the gene responsible for hemochromatosis type 3,[2] the function of the second transferrin receptor (TFR2) has remained obscure. The role of TFR2 as a component of the liver iron-sensing machinery and hepcidin activator is well established, but the molecular mechanisms remain unclear. The role of TFR2 as a partner of EPOR in immature erythroid cells has been clearly defined, and our recent results have shown that it negatively controls erythropoiesis expansion in iron deficiency.[30]

In this study we have expanded our knowledge on the structure of TFR2, identifying its soluble form (sTFR2). sTFR2 was detected in the media of different cell lines transfected with TFR2 and most importantly was present in the culture media of both erythroid cell lines and primary human erythroid cells that endogenously express TFR2.[16,17]

We showed that sTFR2 is shed from the membrane-exposed receptor. This conclusion is supported by two lines of evidence: (i) the lack of sTFR2 shedding when the receptor does not reach the cell surface, as after brefeldin-A treatment; (ii) the increase of sTFR2 release in the opposite condition, when the receptor is stabilized on the membrane by a mutant dynamin.

TFR2 associates with different partners (EPOR in erythroid cells, HJV and HFE in the liver) and likely has different functions in the two tissues in which it is highly expressed. However, the shedding mechanism appears to be under a common iron-mediated regulation. Indeed binding of the holo-TF ligand to the receptor inhibits sTFR2 release, while in the absence of ligand binding the release is increased in both hepatoma and erythroid cells, providing a common iron sensing mechanism.

Holo-TF binds to the RGD motif in the TFR2 ectodomain. Importantly, the RGD mutant $TFR2^{C679A}$, unable to bind the ligand,[28] is insensitive to the shedding regulation. This phenomenon clearly indicates that the shedding process is directly controlled by the receptor-ligand molecular interaction and, as previously reported for TFR1, couples the TFR2 shedding process with iron deficiency. However, the release of TFR2 does not require TFR1. It is reasonable that the shedding of the two receptors occurs separately, since their expression is maximal at different stages of maturation of the erythroid cells, *TFR2* being expressed in more immature erythroid precursors than *TFR1*.[16,17] Also in the liver, *Tfr2* expression increases during mouse development in parallel with the decrease of *Tfr1* expression.[8] Furthermore, the two receptors are likely cleaved by different proteases. The consensus cleavage site for PCSK7, the proconvertase that cleaves TFR1, is not conserved in TFR2 (*Online Supplementary Figure S6*). The observed inhibition of TFR2 shedding by the proconvertase inhibitor decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chloromethylketone (CMK) indicates that a furin-like proconvertase operates the cleavage. However, both furin and PCSK7, the proteases involved in sHJV[31] and sTFR1[20] cleavage are not involved in TFR2 shedding (*Online Supplementary Figure S6*). Overall, our results indicate that removal of TFR2 from the cell surface is not only due to lack of receptor stabilization, but is dependent on an active cleavage process. It is conceivable that membrane stabilization of TFR2 by holo-TF subtracts the receptor from the protease activity by changing its conformation or by hiding the cleavage site. The definition of these molecular mechanisms requires further studies. We cannot exclude that, as previously reported,[4] decreased endocytosis and TFR2 lysosomal degradation might also occur in addition to the reduced shedding in the presence of the ligand.

Different proteins and receptors acquire distinct functions when present either as membrane-bound or soluble forms, as shown for HJV.[31-33] We cannot exclude a dual and opposite role also in the case of TFR2. Sensing the increased concentration of the ligand, membrane TFR2 is proposed to be involved in hepcidin activation to reduce the levels of circulating iron.[12] Its soluble counterpart might act as an inhibitor to attenuate the signaling pathway, in conditions of reduced iron availability, to increase iron absorption. We consistently showed a modest inhibition of hepcidin promoter activation by sTFR2, but not of endogenous hepcidin in hepatic cell lines (*data not shown*). In addition, when iron deficiency is induced in double knock-out $Tfr2^{-/-}$, $Tmprss6^{-/-}$ mice, hepcidin is inhibited, ruling out a significant contribution of sTfr2, which cannot be produced in these animals.[34] Thus a decoy function on hepcidin activation is unlikely. However, irrespective of sTFR2 function, removal of membrane TFR2 in iron deficiency would negatively affect hepcidin activation.

An erythroid role for Tfr2 in conditions of low iron has recently been suggested by the observation that iron deficiency caused by ablation of the hepcidin inhibitor *Tmprss6* induces erythrocytosis in mice knock-out for *Tfr2*, but not in mice with liver-specific *Tfr2* deletion (which preserves the Tfr2 erythroid function.[34] This event was directly confirmed by the increased erythropoiesis observed in mice that had *Tfr2* exclusively deleted in the bone marrow.[30]

sTFR2 added to the culture media of transfected cells does not seem to modify the affinity of EPO for EPOR or the cell surface expression of EPOR. Consequently, EPO-mediated signaling appears not to be affected. Preliminary experiments show that the addition of sTFR2 to the culture medium of primary human erythroblasts does not affect their proliferation, survival or terminal differentiation (*data not shown*). However, irrespective of sTFR2 function, shedding membrane TFR2 in iron deficiency might serve to decrease the receptor's interaction with EPOR and to increase EPO sensitivity of erythroid cells, as recently shown in mice with bone marrow-specific *Tfr2* deletion.[30] The lower affinity for holo-TF as compared with TFR1

makes TFR2 an ideal sensor of iron deficiency in the bone marrow which could anticipate the iron needs of maturing erythroblasts. It is possible that when holo-TF concentration starts decreasing, TFR2 would be shed from the membrane, whereas TFR1, because of its higher affinity, would still be able to bind holo-TF.

In conclusion we provide *in vitro* evidence of TFR2 shedding, a mechanism regulated by holo-TF, in analogy with the process described for TFR1. Although the *in vivo* role of sTFR2, as well as that of sTFR1, remains to be clarified, we suggest that while membrane TFR2 in the liver senses excess iron, TFR2 in the bone marrow has the opposite role of sensing iron-deficiency. This would explain why the effect of lack of TFR2 shedding is not evident in *TFR2*-hemochromatosis in which iron-deficiency is never achieved.[6,15]

Acknowledgments

We are indebted to Hiroshi Kawabata (Department of Hematology/Oncology, Kyoto University, Japan) and H. Phillip Koeffler (UCLA/Cedars-Sinai Medical Center, USA) for the kind gift of TFR2WT-N-FLAG and TFR2G679A constructs and to Caroline Enns (Oregon Health and Science University, Portland, Oregon, USA) for CHO-Trvb-0 cells. We thank Martina Muckenthaler (University of Heidelberg, Germany) for providing us with the HuH7 cell line and Jerry Kaplan (University of Utah, Salt Lake City, Utah, USA) for wild type and mutant Dynamin constructs. We are extremely grateful to Dr Nabih Azar (la Pitié Salpétrière Hospital, Paris, France) for providing the cytapheresis samples.

Funding

This work was supported in part by funds from "Telethon Onlus Foundation" (grant GGP12025), and Ricerca Finalizzata RF-2010-2312048, Ministero Sanità, MIUR-PRIN (Progetto di Rilevante Interesse Nazionale) 2010-2011 to CC and from the Agence National de la Recherche (ANR, ERYFER project) to PM. MV was funded by The Société Française d'Hématologie and the Fondation pour la Recherche Médicale.

Authorship and Disclosures

Information on authorship, contributions, and financial & other disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at www.haematologica.org.

References

1. Kawabata H, Yang R, Hirama T, et al. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. J Biol Chem. 1999;274(30):20826-20832.
2. Camaschella C, Roetto A, Cali A, et al. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. Nat Genet. 2000;25(1):14-15.
3. Wallace DF, Summerville L, Lusby PE, Subramaniam VN. First phenotypic description of transferrin receptor 2 knockout mouse, and the role of hepcidin. Gut. 2005;54(7):980-986.
4. Johnson MB, Chen J, Murchison N, Green FA, Enns CA. Transferrin receptor 2: evidence for ligand-induced stabilization and redirection to a recycling pathway. Mol Biol Cell. 2007;18(3):743-754.
5. Roetto A, Di Cunto F, Pellegrino RM, et al. Comparison of 3 Tfr2-deficient murine models suggests distinct functions for Tfr2-alpha and Tfr2-beta isoforms in different tissues. Blood. 2010;115(16):3382-3389.
6. Nemeth E, Roetto A, Garozzo G, Ganz T, Camaschella C. Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis. Blood. 2005;105(4):1803-1806.
7. Fleming RE, Migas MC, Holden CC, et al. Transferrin receptor 2: continued expression in mouse liver in the face of iron overload and in hereditary hemochromatosis. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97(5):2214-2219.
8. Kawabata H, Germain RS, Ikezoe T, et al. Regulation of expression of murine transferrin receptor 2. Blood. 2001;98(6):1949-1954.
9. Camaschella C, Roetto, A. TFR2-related hereditary hemochromatosis. GeneReviews (Internet). 2011 update 2011 Jun 09.
10. Johnson MB, Enns CA. Diferric transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability. Blood. 2004;104(13):4287-4293.
11. D'Alessio F, Hentze MW, Muckenthaler MU. The hemochromatosis proteins HFE, TfR2, and HJV form a membrane-associated protein complex for hepcidin regulation. J Hepatol. 2012;57(5):1052-1060.
12. Chen J, Enns CA. Hereditary hemochromatosis and transferrin receptor 2. Biochim Biophys Acta. 2012;1820(3):256-263.
13. Rishi G, Crampton EM, Wallace DF, Subramaniam VN. In situ proximity ligation assays indicate that hemochromatosis proteins Hfe and transferrin receptor 2 (Tfr2) do not interact. PLoS One. 2013;8(10):e77267.
14. Wallace DF, Summerville L, Crampton EM, Frazer DM, Anderson GJ, Subramaniam VN. Combined deletion of Hfe and transferrin receptor 2 in mice leads to marked dysregulation of hepcidin and iron overload. Hepatology. 2009;50(6):1992-2000.
15. Girelli D, Trombini P, Busti F, et al. A time course of hepcidin response to iron challenge in patients with HFE and TFR2 hemochromatosis. Haematologica. 2011;96(4):500-506.
16. 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):2714-2719.
17. Forejtnikova H, Vieillevoye M, Zermati Y et al. Transferrin receptor 2 is a component of the erythropoietin receptor complex and is required for efficient erythropoiesis. Blood. 2010;116(24):5357-5367.
18. Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. Clin Chim Acta. 2003;329(1-2):9-22.
19. Skikne BS. Serum transferrin receptor. Am J Hematol. 2008;83(11):872-875.
20. Guillemot J, Canuel M, Essalmani R, Prat A, Seidah NG. Implication of the proprotein convertases in iron homeostasis: proprotein convertase 7 sheds human transferrin receptor 1 and furin activates hepcidin. Hepatology. 2013;57(6):2514-2524.
21. Oexle K, Ried JS, Hicks AA, et al. Novel association to the proprotein convertase PCSK7 gene locus revealed by analysing soluble transferrin receptor (sTfR) levels. Hum Mol Genet. 2011;20(5):1042-1047.
22. De Domenico I, Ward DM, Langelier C, et al. The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. Mol Biol Cell. 2007;18(7):2569-2578.
23. Pagani A, Silvestri L, Nai A, Camaschella C. Hemojuvelin N-terminal mutants reach the plasma membrane but do not activate the hepcidin response. Haematologica. 2008;93(10):1466-1472.
24. Shih YJ, Baynes RD, Hudson BG, Flowers CH, Skikne BS, Cook JD. Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue receptor. J Biol Chem. 1990;265(31):19077-19081.
25. Traub LM, Kornfeld S. The trans-Golgi network: a late secretory sorting station. Curr Opin Cell Biol. 1997;9(4):527-33.
26. Altschuler Y, Barbas SM, Terlecky LJ et al. Redundant and distinct functions for dynamin-1 and dynamin-2 isoforms. J Cell Biol. 1998;143(7):1871-1881.
27. Dassler K, Zydek M, Wandzik K, Kaup M, Fuchs H. Release of the soluble transferrin receptor is directly regulated by binding of its ligand ferritransferrin. J Biol Chem. 2006;281(6):3297-3304.
28. Kawabata H, Tong X, Kawanami, T et al. Analyses for binding of the transferrin family of proteins to the transferrin receptor 2. Br J Haematol. 2004;127(4):464-473.
29. Kawabata H, Germain RS, Vuong PT, Nakamaki T, Said JW, Koeffler HP. Transferrin receptor 2-alpha supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo. J Biol Chem. 2000;275(22):16618-16625.
30. Nai A, Lidonnici MR, Rausa M, et al. The second transferrin receptor regulates red blood cell production in mice. Blood. 2015;125(7):1170-1179.
31. Silvestri L, Pagani A, Camaschella C. Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. Blood. 2008;111(2):924-931.
32. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, et al. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. Nat Genet. 2006;38(5):531-539.
33. Lin L, Nemeth E, Goodnough JB, Thapa DR, Gabayan V, Ganz T. Soluble hemojuvelin is released by proprotein convertase-mediated cleavage at a conserved polybasic RNRR site. Blood Cells Mol Dis. 2008;40(1):122-131.
34. Nai A, Pellegrino RM, Rausa M, et al. The erythroid function of transferrin receptor 2 revealed by Tmprss6 inactivation in different models of transferrin receptor 2 knockout mice. Haematologica. 2014;99(6):1016-1021.

Comment on: PACE4 (PCSK6): another proprotein convertase linked to iron homeostasis?

We thank the authors of this letter[1] for their interest in our paper[2] and for their detailed analysis of the evidence for and against the proteases responsible for the cleavage of transferrin receptor-2 (TFR2) from the cell surface in hepatocytes and erythroid cells. Their hypothesis of PACE4 (PCSK6) as the most reasonable candidate protease responsible for cleaving TFR2 on plasma membrane and releasing its soluble component is intriguing. After the identification of soluble TFR2 (sTFR2) in the media of transfected and primary cells[3] we made several attempts to identify the protease involved in TFR2 shedding. As reported in the paper,[2]

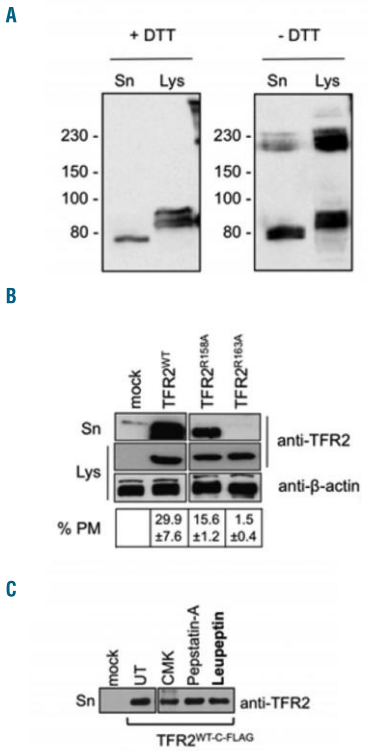


Figure 1. (A). Supernatants and cellular lysates from UT7 cells were analyzed by western blot using anti-TfR2 antibody. DTT was added (+DTT) or not to the samples (-DTT). (B). HeLa cells were transiently transfected with the empty vector (mock), wild-type TFR2, and R158A and R163A TFR2 variants. The supernatants and the cellular lysates were analyzed by western blot using anti-TFR2 antibody. Anti-actin was used for normalization. % PM is the ratio between non-permeabilized to permeabilized cells in the quantitative binding assay.[4] (C). The supernatants of HeLa cells transiently transfected with the empty vector and TFR2 construct were analyzed by western blot using anti-TFR2 antibody in the untreated condition and after 24 h of treatment with the protease inhibitors CMK (50 μM), pepstatin-A (100 μM) and leupeptin (100 μM). Sn: supernatant; Lys: total cellular lysate.

and also discussed by the Guillemot *et al.*,[1] we were able to exclude some potential candidates that are already known to have a role in iron metabolism, namely furin and PCSK7, but we did not reach definitive conclusions. We, therefore, generated an artificial form of sTFR2 corresponding to the whole ectodomain of TFR2 from position 105 whose size, based on gel migration, overlaps the natural form (see Figure 1A in the original paper[2]).

Guillemot *et al.* propose the interesting hypothesis that the proprotein convertase PACE4 might be the protease involved based on its expression and inhibition by CMK: this hypothesis deserves experimental validation. Still, the size of a product cleaved at position R163, the proposed cleavage site of PACE4, is difficult to reconcile with the size of the released form (see Figure 1A of the original paper[2]) since the product of the cleavage would be 60 amino acids shorter. In addition we observed that in non-denaturing conditions sTFR2 shows a high molecular weight band compatible with dimer formation (Figure 1A). This suggests that cysteines at positions 108 and 111, the only potentially involved in a disulfide bond in the stem region, are most likely preserved in sTFR2. This would exclude a cleavage C terminal to such a position, including the presumptive **R**QTSL**R** consensus sequence of PACE4 at positions 158-163. In addition a mutation of Arginine 158 to Alanine (R158A) that is partially defective in plasma membrane localization did not suppress TFR2 release. Unfortunately, no conclusion can be drawn on R163A, because the corresponding protein does not reach the cell surface (Figure 1B). Finally sTFR2 release was not inhibited by leupeptin (Figure 1C), which was reported to inhibit PACE4.[5] For all these reasons we did not consider PACE4 as a possible candidate. Obviously all these speculations do not exclude the possibility of indirect cleavage of TFR2 by other proteases that are targets of PACE4 (PCSK6) activation. In brief, until verified experimentally this protease remains an interesting candidate.

Alessia Pagani,[1,2] Meriem Ladli,[3,4,5] Antonella Nai,[1,2] Frederique Verdier,[3,4,5] Clara Camaschella,[1,2] and Laura Silvestri[1,2]

[1]Vita Salute University, Milan, Italy; [2]San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy; [3]Institut Cochin, INSERM, U1016, Université Paris Descartes, CNRS (UMR8104), Paris, France; [4]Ligue National contre le Cancer, Paris, France; and [5]LABEX (Laboratoire d'Excellence) GR-Ex, Paris, France

Correspondence: silvestri.laura@hsr.it
doi:10.3324/haematol.2015.128348

Key words: PACE4, transferrin receptor-2, iron homeostasis, proprotein convertase.

Information on authorship, contributions, and financial & other disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at www.haematologica.org.

References

1. Guillemot J, Seidah NG. PACE4 (PCSK6): another proprotein convertase link to iron homeostasis? Haematologica 2015;xxx
2. Pagani A, Vieillevoye M, Nai A, et al. Regulation of cell surface transferrin receptor-2 by iron-dependent cleavage and release of a soluble form. Haematologica. 2015;100(4):458-465.
3. Mains RE, Berard CA, Denault JB, Zhou A, Johnson RC, Leduc R. PACE4: a subtilisin-like endoprotease with unique properties. Biochem J. 1997;321(3):587-593.
4. Pagani A, Silvestri L, Nai A, Camaschella C. Hemojuvelin N-terminal mutants reach the plasma membrane but do not activate the hepcidin response. Haematologica. 2008;93(10):1466-1472.