



Homéostasie cellulaire du fer dans les cellules leucémiques myéloïdes

Emmanuel Pourcelot

► To cite this version:

Emmanuel Pourcelot. Homéostasie cellulaire du fer dans les cellules leucémiques myéloïdes. Hématologie. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAS010 . tel-01423710

HAL Id: tel-01423710

<https://theses.hal.science/tel-01423710>

Submitted on 31 Dec 2016

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

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Doctorat ISCE/Biotechnologie, instrumentation, signal.**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Mr Pourcelot Emmanuel

Thèse dirigée par **le Professeur Pascal Mossuz** et
co-dirigée par **le Docteur Jean-Marc Moulis**

préparée au sein du laboratoire **Techniques de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité**, en collaboration avec le **Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée** dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la santé, la cognition, l'environnement**.

Homéostasie cellulaire du fer dans les cellules leucémiques myéloïdes

Thèse soutenue publiquement le **30 juin 2015**,
devant le jury composé de :

Mr Jean-Yves CAHN,

PU-PH, Hôpital Michallon, Grenoble, Président

Mme Hélène PUCCIO,

Directeur de recherche, Inserm U964, Illkirch, Rapporteur

Mr François DREYFUS

PU-PH, Hôpital Cochin, Paris, Rapporteur

Mr Christophe HOURDE,

MCU, Université Savoie Mont Blanc, Chambéry, Membre

Mr Jean-Marc MOULIS,

Chercheur, CEA-LBFA, Grenoble, Membre

Mr Pascal MOSSUZ,

PU-PH, Hôpital Michallon, Grenoble, Membre



"Give me the time to make mistakes and in return I'll give you genius"

S. Way

Remerciements

Je souhaite avant tout à exprimer mes vives remerciements aux membres du jury

- *Au Docteur Hélène Puccio et au Professeur François Dreyfus pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture critique de mon travail.*
- *Au Professeur Jean-Yves Cahn et au Docteur Christophe Hourdé d'avoir acceptés de participer à ce jury.*
- *Au Professeur Pascal Mossuz, Directeur de thèse*

Merci de m'avoir accueilli au laboratoire d'hématologie durant ces trois années et demi de thèse, plus les deux premières années d'internat. Je vous remercie de m'avoir fait confiance, de m'avoir laissé des libertés d'action dans le travail hospitalier au centre d'exploration de l'hématopoïèse, puis de m'avoir encouragé et encadré pour ce travail de thèse.

- *Au Docteur Jean-Marc Moulis, Co-directeur de thèse*

Merci de m'avoir accueilli au CEA, puis au LBFA, de m'avoir encadré au quotidien pour ce travail, et d'avoir essayé tant bien que mal de me faire partager votre passion pour la recherche.

Et ensuite, mes remerciements vont aux nombreuses autres personnes avec qui j'ai travaillé au CHU, au CEA, à la faculté et au LBFA.

- *Au professeur Benoit Polack*

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de l'équipe TheREx du laboratoire TIMC, et vous remercie de votre soutien lors de la recherche d'un financement pour un prolongement en quatrième année de thèse.

- *Au professeur Uwe Schlattner*

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de du laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée.

Remerciements

- *Aux équipes du DHOGI, praticiens et techniciens,*

tout particulièrement à Julie pour sa compagnie lors des manip tardives au CHU, et à l'équipe très féminine de la cellule qualité du DHOGI avec des réunions toujours dans la bonne humeur.

- *A mes techniciennes de routine hospitalière préférées : Anne, Lauriane et Camille*

Merci de votre soutien, votre bonne humeur et votre investissement, même quand j'ai bousculé vos pratiques. Je vous souhaite bon courage pour la suite.

- *A notre cadre de choc : Patricia*

Merci pour ta disponibilité, ton aide, ta bonne humeur et surtout ton efficacité.

- *A nos secrétaires : Christine, Amandine G., Audrey, Emilie, Amandine L. et Cyrielle.*

- *A toute l'équipe de CGD avec laquelle j'ai toujours gardé de bons liens.*

- *Aux techniciennes du laboratoire des éléments traces, Dominique et Marie-Christine.*

- *A celles qui m'ont permis de compléter ou multiplier les expérimentations au CEA et au LBF A: Peggy et Marine*

Merci de votre soutien, vos conseils et votre aide pour certaines techniques.

- *A toute l'équipe TheREx dont la team SP, Mathieu et Sarah, avec lesquels j'ai cohabité en salle de culture cellulaire.*

- *Aux collègues du CEA durant une année et demi: Mireille, Alexandre et Mohammed.*

- *A mes collègues IPR et "assimilés IPR": Delphine, Julie, Kathy, Sébastien, Pauline, Claire et Nuria.* Merci pour les moments de détente, et particulièrement à Julie avec laquelle j'ai partagé un bureau durant un an.

- *Au personnel du LBF A et tout particulièrement à la team du midi et des séances piscine: Fred, Cécile, Cindy, Gérard, Christophe et Sandrine.*

- *Aux étudiants du LBF A : l'ancien équipe avec Marie, Clovis, Sarah, Charline, Martin, et Fayçal, et aux petits nouveaux Raphaella, Adeline, Camille et Arthur.*

- *A mon meilleur amis depuis de nombreuses années: Thomas*

- *Et le plus grand merci à mes parents et l'ensemble de ma famille*

Vous m'avez soutenu, laissé le choix et encouragé dans ce long parcours d'étude, sans toujours comprendre ce que je faisais et où j'allais, et malheureusement pour le plus grand nombre vous ne m'aurez pas vu sortir de ce long tunnel, où depuis d'autres ciex. Une pensée toute particulière à ma mère qui me manque terriblement.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	3 -
TABLE DES MATIERES	5 -
TABLE DES ILLUSTRATIONS	10 -
LISTE DES TABLES.....	12 -
LISTE DES ABREVIATIONS.....	13 -
REVUE GENERALE DE LA LITTERATURE.....	16 -
1. LEUCEMIES AIGÛES MYELOBLASTIQUES (LAM)	16 -
1.1 Informations générales.....	16 -
1.2 Incidence et survie	16 -
1.3 Physiopathologie	17 -
1.3.1 L'origine des clones leucémiques: le concept de cellules souches leucémiques	17 -
1.3.2 Dérégulation de la survie et de la prolifération.....	18 -
1.3.3 Perturbation du processus de différenciation	22 -
1.3.4 Processus d'échappement à la mort cellulaire	22 -
1.3.5 Autres anomalies génétiques.....	23 -
1.3.6 Anomalies épigénétiques	24 -
1.3.7 Anomalies métaboliques	26 -
1.4 Aspect clinique.....	27 -
1.5 Diagnostic biologique.....	28 -
1.5.1 Cytologie et cytochimie.....	28 -
1.5.1 Immunophénotypage	30 -
1.5.2 Cytogénétique	32 -
1.5.3 Biologie moléculaire	33 -
1.5.4 Analyse à grande échelle	35 -
1.6 Le traitement.....	36 -
1.7 Pronostic.....	38 -
1.7.1 Les facteurs pronostiques cliniques	38 -
1.7.2 Les facteurs pronostiques biologiques.....	39 -
2. L'HOMEOSTASIE DU FER.....	42 -
2.1 Le trafic du fer chez l'homme.....	43 -
2.1.1 L'absorption.....	43 -

Table des matières

2.1.2	Distribution, utilisation et recyclage.....	- 43 -
2.1.3	Régulation	- 46 -
2.2	<i>Régulation cellulaire du fer: le système IRE-IRP</i>	- 48 -
2.2.1	Structure et fonctionnement.....	- 48 -
2.2.2	Autres stimuli du système IRE-IRP.....	- 54 -
2.2.3	Dysfonctionnement du système régulateur et pathologies associées	- 54 -
2.3	<i>Les chélateurs du fer en thérapeutique</i>	- 56 -
3.	RESEAU REGULATEUR DU FER ET RESEAU REDOX DANS L'HEMATOPOÏÈSE NORMALE ET LEUCEMIQUE	- 60 -
3.1	<i>Le fer et son système régulateur IRE-IRP dans l'hématopoïèse normale</i>	- 60 -
3.2	<i>Contrôle redox de l'hématopoïèse normale</i>	- 62 -
3.3	<i>Relation entre l'équilibre redox, l'homéostasie du fer et leucémogénèse</i>	- 65 -
OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE.....		- 68 -
 CHAPITRE I : CARACTERISATION DU RESEAU FER ORGANISE AUTOUR DU SYSTEME REGULATEUR CENTRAL IRE-IRP DANS LES CELLULES LEUCEMIQUES EN CONDITIONS DE PROLIFERATION ET DE DEPLETION EN FER		
		- 70 -
1.	CONTEXTE.....	- 71 -
1.1	<i>L'action du système régulateur IRE-IRP est tissu dépendante au sein d'un organisme.....</i>	<i>- 71 -</i>
1.2	<i>Spécificité d'action des régulateurs IRP 1 et 2 sur la traduction des ARN messagers cibles</i>	<i>- 73 -</i>
2.	ARTICLE EN PREPARATION.....	- 75 -
2.1	<i>Abstract</i>	- 76 -
2.2	<i>Introduction</i>	- 77 -
2.3	<i>Materials and methods</i>	- 79 -
2.3.1	<i>Cell lines</i>	- 79 -
2.3.2	<i>Iron depletion</i>	- 79 -
2.3.3	<i>IRP activity measurement</i>	- 79 -
2.3.4	<i>Western blotting</i>	- 80 -
2.3.5	<i>Cloning of regulatory IRE in pGL3-control</i>	- 80 -
2.3.6	<i>Cell transfection and in cellulo measurement of IRE –IRP activity</i>	- 82 -

Table des matières

2.3.7	Measurements of mRNA.....	- 82 -
2.3.8	Absolute quantification of mRNA.....	- 83 -
2.4	<i>Results</i>	- 84 -
2.4.1	Iron regulation of the Iron Regulatory Proteins in models of myeloid leukemic cells.....	- 84 -
2.4.2	Quantitative analysis of Iron regulatory Proteins in models of myeloid leukemic cells .	- 86 -
2.4.3	The targets of IRP: transcriptional profiles	- 87 -
2.4.4	Efficiency of the Iron Regulatory Proteins to repress translation by Iron Responsive Elements	- 90 -
2.5	<i>Discussion</i>	- 93 -
2.6	<i>Acknowledgement</i>	- 97 -
2.7	<i>Supplementary material</i>	- 97 -
CHAPITRE II : CONCENTRATION FONCTIONNELLE EN FER DANS LES PROGENITEURS HEMATOPOÏETIQUES ET DEUX LIGNEES LEUCEMIQUES HUMAINES.....		- 98 -
1.	CONTEXTE.....	- 99 -
1.1	<i>Les mesures de fer intracellulaire</i>	- 99 -
1.2	<i>La concentration fonctionnelle en fer une donnée d'intérêt en thérapeutique</i>	- 101 -
2.	ARTICLE.....	- 102 -
2.1	<i>Abstract</i>	- 103 -
2.2	<i>Introduction</i>	- 104 -
2.3	<i>Materials and Methods</i>	- 105 -
2.3.1	Reagents.....	- 105 -
2.3.2	Cell lines	- 105 -
2.3.3	Purification of CD34 ⁺ progenitors.....	- 106 -
2.3.4	Iron depletion and proliferation assay for cell lines.....	- 106 -
2.3.5	Amplification, iron depletion, and proliferation assay for CD34 cells.....	- 107 -
2.3.6	Cell cycle assays.....	- 107 -
2.3.7	Iron measurements.....	- 107 -
2.3.8	IRP activity measurement.....	- 108 -
2.3.9	Western blotting	- 108 -
2.3.10	Measurement of intracellular reactive oxygen species (ROS).....	- 108 -
2.3.11	Measurement of lipid peroxidation	- 109 -
2.3.12	Measurements of mRNA.....	- 109 -
2.3.13	Statistical analysis	- 109 -

Table des matières

2.4	<i>Results</i>	- 111 -
2.4.1	Iron withdrawal and growth arrest.....	- 111 -
2.4.2	Iron- or transferrin-triggered recovery from the iron-depleted state	- 111 -
2.4.3	Molecular changes associated with iron replenishment.....	- 115 -
2.4.4	Derivation of the iron concentration needed for cellular growth.....	- 117 -
2.4.5	Transferrin dependence for amplification of CD34 ⁺ progenitors	- 121 -
2.5	<i>Discussion</i>	- 122 -
2.5.1	Significance of Functional intra-cellular Iron Concentration (FIC)	- 122 -
2.5.2	Consequences for normal and pathological hematopoiesis, and other conditions	- 124 -
2.6	<i>Conclusions</i>	- 125 -
2.7	<i>Acknowledgments</i>	- 125 -
2.8	<i>Appendix</i>	- 126 -
2.9	<i>Supplementary material</i>	- 127 -

CHAPITRE III : DESCRIPTION DU SYSTEME REGULATEUR IRE-IRP DANS LES PROGENITEURS LEUCEMIQUES DE PATIENTS ATTEINTS DE LEUCEMIE AIGÛE MYELOÏDE - 132 -

1.	CONTEXTE	- 133 -
1.1	<i>La modulation du fer dans les leucémie aiguës myéloïdes impacte le destin cellulaire.....</i>	- 133 -
1.2	<i>L'effet bénéfique de la modulation du fer dans une autre forme d'hémopathie maligne, les syndromes myélodysplasiques.....</i>	- 135 -
2.	ARTICLE EN PREPARATION	- 136 -
2.1	<i>Abstract</i>	- 137 -
2.2	<i>Introduction</i>	- 138 -
2.3	<i>Materials and Methods</i>	- 140 -
2.3.1	Biological materials.....	- 140 -
2.3.2	Culture and media	- 141 -
2.3.3	IRP activity measurement.....	- 141 -
2.3.4	Western blotting	- 141 -
2.3.5	RT-qPCR reaction	- 142 -
2.4	<i>Results</i>	- 144 -
2.4.1	Status of the IRE-IRP system in leukemic cells.....	- 144 -
2.4.1	Transcriptional profiles of the iron network in Healthy and leukemic progenitors	- 147 -
2.5	<i>Discussion</i>	- 151 -

Table des matières

2.5.1	A particular regulation of iron in primary leukemic cells of AML patients.....	- 151 -
2.5.2	The targets of IRP system are quantitatively similar in normal hematopoietic progenitors and in AML CD34+ blasts	- 153 -
2.6	<i>Conclusion</i>	- 154 -
2.7	<i>Acknowledgements</i>	- 154 -
2.8	<i>Supplementary material</i>	- 154 -
 CHAPITRE IV : EXPERIMENTATIONS COMPLEMENTAIRES		- 156 -
1.	CONTEXTE	- 157 -
2.	MATERIALS AND METHODS	- 157 -
2.1	<i>Medium culture</i>	- 157 -
2.2	<i>Flow cytometric analysis</i>	- 157 -
2.3	<i>Differentiation assays</i>	- 158 -
2.4	<i>In vitro erythroïd burst-forming unit (BFU-E) and Granulo-monocytic colony forming unit (CFU-GM) assays</i>	- 158 -
2.5	<i>Cytology</i>	- 158 -
3.	RESULTS	- 160 -
3.1.1	Cord blood CD34+ progenitors grow in a minimal medium but not leukemic progenitors.	- 160 -
3.1.2	Transferrin dependence of the differentiation of cord blood CD34+ progenitors.....	- 162 -
3.1.3	Iron modulation is not sufficient to engage differentiation in short term cultures of one primary AML.....	- 165 -
4.	DISCUSSION	- 167 -
 DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES		- 170 -
1.	UN SYSTEME REGULATEUR IRE-IRP ACTIF, FONCTIONNEL ET SOUS LA DEPENDANCE DE LA CONCENTRATION EN FER	- 171 -
2.	ABSENCE DE STRESS OXYDANT APRES CARENCE EN FER POUR LES DEUX MODELES	- 174 -
3.	UN DESTIN CELLULAIRE DIFFERENT MAIS UN BESOIN ELEMENTAIRE EN FER IDENTIQUE -	175 -
4.	QUELQUES DIFFERENCES DE GESTION DU FER QUI REFLETENT UN DESTIN CELLULAIRE DIFFERENT AU SEIN DES MODELES CELLULAIRES LEUCEMIQUES	- 179 -
5.	CONSERVATION DU SYSTEME IRE-IRP ENTRE CELLULES SAINES ET MALIGNES	- 182 -
 RÉFÉRENCES		- 185 -

Table des illustrations

Figure 1. Origine et phénotype de surface des cellules souches leucémiques.....	- 17 -
Figure 2. Dérégulation de la transduction du signal dans les LAM	- 20 -
Figure 3. Impact des mutation IDH, des ERO et de la carence en fer sur les cellules souches leucémiques.....	- 26 -
Figure 4. Illustration de la diversité moléculaire des patients sans anomalies caryotypiques.	- 33 -
Figure 6. Mécanisme d'absorption du complexe fer-transferrine par endocytose.....	- 44 -
Figure 7. Les flux du fer dans les différents types cellulaires.	- 45 -
Figure 8. Le fer et son système de régulation IRP/IRE au niveau des érythroblastes.....	- 49 -
Figure 9. Structure secondaire du motif IRE.	- 51 -
Figure 10. Fonctionnement du système Iron Responsive Element - Iron Regulatory Protein. -	52 -
Figure 11. Conséquence de l'activation/inactivation des IRP sur la traduction des transcrits cibles.....	- 53 -
Figure 12. Structure chimique des chélateurs.	- 58 -
Figure 13. Choix d'un traitement par chélateur en fer.....	- 60 -
Figure 14. Les HSC dans la niche hématopoïétiques et les caractéristiques liées aux conditions hypoxiques.	- 64 -
Figure 15. Système d'activation et de régulation du cycle cellulaire lors de condition de disponibilité en fer suffisante.	- 66 -
Figure I-1. Structure de quelques IRE.....	- 73 -
Figure I-1. IRP activity in KG1 and K562 cell lines before and after DFO treatment.....	- 85 -
Figure I-2. IRP1 quantification.....	- 86 -
Figure I-3. Relative expression of several mRNAs belonging to the in iron network of proliferating cells or measured for comparison (e.g. HO-2).	- 88 -
Figure I-4. Regulation operate by endogen IRP on introduced IRE.....	- 91 -
Figure I-S1. Method for measurement of regulation operated by endogenous IRP on exogenous IRE.....	- 97 -

Table des illustrations

<i>Figure II-1. Comparison of growing and chelator-treated cells.</i>	<i>- 110 -</i>
<i>Figure II-2. Cell growth and intracellular iron replenishment of KG1 cells according to the iron source.</i>	<i>- 112 -</i>
<i>Figure II-3. Recovery of iron-depleted K562 cells after addition of holo-transferrin.</i>	<i>- 114 -</i>
<i>Figure II-4. Evolution of iron-depleted K562 cells after addition of apo-transferrin.</i>	<i>- 116 -</i>
<i>Figure II-5. Iron Regulatory Proteins sensitivity to iron-bound transferrin.</i>	<i>- 118 -</i>
<i>Figure II-6. Amplification of primary CD34⁺ cells.</i>	<i>- 120 -</i>
<i>Figure II-S1. Effect of iron-depletion on lipid peroxidation and on expression of inducible heme oxygenase (HMOX1).</i>	<i>- 129 -</i>
<i>Figure II-S2. Recovery of iron-depleted KG1 cells with holo-transferrin.</i>	<i>- 130 -</i>
<i>Figure II-S3. NDRG1 variations upon holo-transferrin rescue from the iron-depleted state. .</i>	<i>- 131 -</i>
<i>Figure III-1. Identification of the key components of the IRE-IRP regulatory systems. .</i>	<i>- 143 -</i>
<i>Figure III-2. Behavior of IRP systems in AML patients.</i>	<i>- 145 -</i>
<i>Figure III-3. Pattern of relative expression of several transcripts implied, directly or not, in iron network for patients with AML.</i>	<i>- 148 -</i>
<i>Figure III- 4. Comparison of the transcripts relative expression for the healthy cord blood progenitors and leukemic progenitors.</i>	<i>- 149 -</i>
<i>Figure IV-C1. Comparison of proliferation capacity before and after in vitro culture for 3 days in minimal homemade media.</i>	<i>- 159 -</i>
<i>Figure IV-C2. Comparison of the growth of progenitors.</i>	<i>- 160 -</i>
<i>Figure IV-C3. Erythroïd commitment of CD34⁺ cord blood cells according to iron provided by transferrin and to erythropoietin.</i>	<i>- 163 -</i>
<i>Figure IV-C4. Cytological observations of primary AML cells after short time culture. .</i>	<i>- 166 -</i>

Liste des tables

<i>Table I. Classification FAB des leucémies aigües myéloblastiques.....</i>	<i>- 29 -</i>
<i>Table II. Classification WHO des leucémies aigües myéloblastiques.....</i>	<i>- 31 -</i>
<i>Table III. Expression des marqueurs de surface et cytoplasmique utiles au diagnostic de LAM.....</i>	<i>- 32 -</i>
<i>Table IV. Principales mutations identifiées, anomalies cytogénétiques associées et valeur pronostique.</i>	<i>- 34 -</i>
<i>Table VI. Caractéristiques thérapeutiques des chélateurs utilisés en médecine humaine..</i>	<i>- 56 -</i>
<i>Table I-1. Constante de dissociation de IRP1 pour les IRE en 5'.....</i>	<i>- 74 -</i>
<i>Table I-2. IRE used to build plasmids encoding IRP regulated activities.</i>	<i>- 81 -</i>
<i>Table I-3. qPCR primer sequences.....</i>	<i>- 83 -</i>
<i>Table I-4. Absolute transcript quantification in cell lines.....</i>	<i>- 89 -</i>
<i>Table II-S1 Levels of oxidizing species estimated with fluorescent probes.</i>	<i>- 127 -</i>
<i>Table II-S2 Parameters calculated from the IRP activities as analyzed with equations derived in Appendix.</i>	<i>- 128 -</i>
<i>Table III-S1 Biological characteristics of patients at the AML diagnosis.</i>	<i>- 154 -</i>
<i>Table IV-C1. Proportion of selected surface markers present in purified CD34 progenitors kept for a week in liquid culture as described in Materials and Methods.....</i>	<i>- 162 -</i>
<i>Table IV-C2. Granular and erythroïd colony grown on methylcellulose filters in complete medium from CD34 progenitors.....</i>	<i>- 164 -</i>

Liste des abréviations

- **2HG:** 2-HydroxyGlutarate
- **α Glo:** α -globine

- **ACO2:** Aconitase 2 (mitochondriale)
- **ADN:** Acide DésoxyriboNucléique
- **ADNc:** Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
- **ARN:** Acide RiboNucléique
- **ALAS2:** 5-AminoLevulinic Acid Synthase 2
- **ATRA:** Acide tout-trans-rétinoïque

- **BAALC:** Brain and Acute Leukemia Cytoplasmic gene
- **β Glo:** β -globine
- **BM:** Bone Marrow
- **BSA:** Bovine Serum Albumine

- **carboxy-H2DCF-DA:** carboxy-dihydrodichlorofluoresceine diacétate acetyle ester
- **CB:** Cord Blood
- **Cdk:** Cyclin dependent kinase
- **CEBPA:** CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha
- **CSH:** Cellules Souches Hématopoïétiques
- **CSL:** Cellules Souches Leucémiques

- **Dcytb:** Duodenal cytochrome b reductase
- **DFO:** Deferoxamine
- **DMT1:** Divalent Metal Transporter 1
- **DNMT:** DNA MéthylTransférase
- **DTNB:** acide 5,5-DiThiobis-2-NitroBenzoïque

- **EDTA:** Ethylen Diamine Tetraacétique Acide
- **EPO:** érythropoïétine
- **EpoR:** Récepteur de l'Epo
- **ERG:** ETS-Related Gene
- **ERO:** Espèces Réactives de l'Oxygène

- **FAB:** French-American-British group
- **FISH:** Fluorescence In Situ Hybridization
- **FLT3:** FMS Like Tyrosine kinase 3
- **FoxO:** Forkhead box O
- **FPN1:** ferroportine (=SLC401A)

Liste des abréviations

- **FPN1a**: ferroportine (avec IRE)
- **Ft**: Ferritine (protéine)
- **FTH1**: Ferritine heavy/heart (gène)
- **FTL**: Ferritine light/liver (gène)

- **γ Glo**: γ -globine
- **GSH**: glutathion (forme réduite)

- **H₂O₂**: peroxyde d'hydrogène
- **Hb**: Hémoglobine
- **HCP1**: Heme Carrier Protein 1
- **HDAC**: Histone DésACétylase
- **HIF**: Hypoxia Inducible Factor
- **HILPDA**: Hypoxia Inducible Lipid Droplet-Associated
- **HMOX1**: gène codant HO-1
- **HMOX2**: gène codant HO-2
- **HO-1**: Hème Oxygénase-1
- **HO-2**: Hème Oxygénase-2
- **hPRT**: hypoxanthine PhosphoRibosyl Transferase
- **HRE**: Hypoxia Responsive Element
- **HRP**: Horseradish Peroxidase

- **ICP-MS**: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
- **IDH**: Isocitrate DésHydrogénase
- **IPR -/-**: IRP knock out
- **IRP 1**: Iron Regulatory Protein 1
- **IRP2**: Iron Regulatory Protein 2
- **IRE**: Iron Responsive Elements
- **ITD**: Internal Tandem Duplication

- **Jnk**: c-Jun N-terminal Kinase

- **KG**: α -cétoglutarate

- **LAM**: Leucémies Aiguës Myéloblastiques
- **LMC**: Leucémie Myéloïde Chronique

- **MAPK**: Mitogen Activated Protein Kinases
- **MDS**: MyeloDysplastic Syndroms
- **ME**: β 2-MercaptoEthanol
- **MGG**: May-Grunwald-Giemsa
- **MLL-PTD**: Mixed Lineage Leukemia- Partial Tandem Duplication
- **MN1**: Meningioma 1 gene
- **MPO**: myéloperoxidases

Liste des abréviations

- **NADPH:** Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
- **ND:** Non Déterminé
- **NDRG1:** N-myc Down Regulated Gene 1
- **NASDA:** α -Naphthyl acétate estérases
- **NF- κ B:** Nuclear Factor- κ B
- **NPM1:** Nucleophosmin

- **PBMC:** Peripheral Blood Mononuclear Cell
- **PCR:** Polymerase Chain Reaction
- **pRb:** RetinoBlastoma susceptibility gene product

- **qPCR:** quantitative Polymerase Chain Reaction

- **REMSA:** RNA Electrophoretic Mobility gel Shift Assay
- **RR:** Ribonucléotide Réductase
- **RTK:** Récepteurs Tyrosine Kinase

- **SCF:** Stem Cell Factor
- **SSA:** 5-SulfoSalicylique Acide
- **SVF:** Serum de Veau Fétal

- **TBA:** Acide ThioBarbiturique
- **TET2:** Ten-Eleven Translocation 2
- **TfR1:** Transferrin Receptor 1(protéine)
- **TfRC:**gène codant TfR1
- **TKD:** Tyrosine Kinase Domain
- **TPO:** Thrombopoietin

- **VD:** Vitamin D
- **VDR:** Vitamin D Receptor
- **VDRE:** Vitamin D Responsive Element

- **WB:** Western Blot
- **WHO:** World Health Organisation
- **WT1:** Wilms Tumor Suppressor gene 1

Revue générale de la littérature

1. LEUCEMIES AIGÜES MYELOBLASTIQUES (LAM)

1.1 Informations générales

Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) sont des hémopathies malignes caractérisées par une prolifération incontrôlée de précurseurs hématopoïétiques immatures. Cette accumulation de clones malins au niveau médullaire puis sanguin est liée à un blocage du processus de différenciation qui aboutit à une hématopoïèse non fonctionnelle et une insuffisance médullaire. Le caractère aigu est défini par l'évolution rapide vers le décès en l'absence de prise en charge thérapeutique.

1.2 Incidence et survie

Les LAM représentent 30% des leucémies de l'adulte avec une incidence de 2 à 4 pour 100 000 habitants par an. Ce type de leucémie touche des personnes de tout âge, avec une médiane autour de 60 ans. La survie à 5 ans d'un adulte atteint d'une LAM (hors LAM3) est estimée à environ 23% (*Pulte et al., 2013*). Cette survie n'est pas influencée par le sexe mais décroît avec l'âge du patient. Certains facteurs de risque favorisent l'apparition des LAM. Parmi ceux-ci on retrouve l'exposition aux radiations ionisantes, l'exposition à des substances chimiques telles que le benzène, la toxicité du traitement par certains anticancéreux (chlorambucil, cyclophosphamide...), l'évolution d'autres hémopathies malignes (néoplasmes myéloprolifératifs, néoplasmes myélodysplasiques) et les pathologies génétiques congénitales telles que la Trisomie 21, la maladie de Fanconi ou l'ataxie telangiectasie.

1.3 Physiopathologie

1.3.1 L'origine des clones leucémiques: le concept de cellules souches leucémiques

Les cellules initiatrices, dénommées cellules souches leucémiques (CSL) (*Lapidot et al., 1994*), sont des cellules malignes dérivées des cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou de progéniteurs myéloïdes précoces (*Fig. 1A*). Les caractéristiques du phénotype immunologique de surface sont présentées sur la *figure 1B*, ainsi les marqueurs CD90 et CD117 sont différentiellement exprimés, présents sur les CSH mais manquants sur les CSL. CD13, CD123, CD44, CD96 et CLL-1 sont quant à eux présents sur les CSL mais absents ou faiblement exprimés sur les CSH.

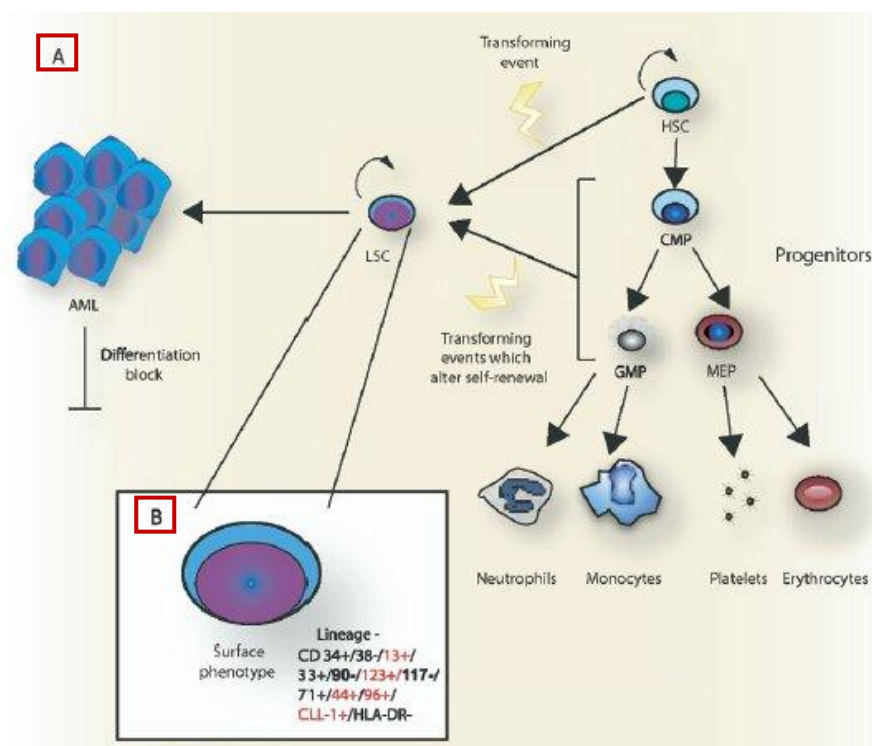


Figure 1. Origine et phénotype de surface des cellules souches leucémiques.

A. Processus d'évolution de la CSH en progéniteurs puis cellules matures ou transformation de cette CSH et progéniteurs en CSL à l'origine de la leucémie. **B.** Immunophénotypage de la CSL avec les marqueurs différentiellement exprimés par rapport à la CSH: en gras ceux absents et en rouge ceux présents. (*Chan and Huntly, 2008*)

Les LAM étant des entités cliniquement et biologiquement hétérogènes, cela suggère l'existence de différents mécanismes moléculaires aboutissant à leur apparition,

mécanismes à ce jour toujours mal identifiés et mal compris. Par leur capacité d'auto-renouvellement et donc de persistance dans la moelle, les CSH peuvent être la cible d'un certain nombre de mutations qui lorsqu'elles s'accumulent aboutissent à l'apparition des CSL, dans un processus dit multi-étapes (*Jordan and Guzman, 2004*). Il a été également constaté par des expérimentations chez la souris que l'activation de gènes spécifiques chez des progéniteurs précoces, gènes considérés comme des oncogènes associés aux leucémies, pouvait rétablir la capacité d'auto-renouvellement spécifique aux CSH (*Chan and Huntly, 2008; Cozzio et al., 2003; Krivtsov et al., 2006*).

On a donc des possibilités de destin cellulaire identiques pour CSH et CSL, à savoir auto-renouvellement, différenciation, apoptose ou quiescence, mais les processus contrôlant ces choix sont dérégulés dans les CSL.

La leucémogénèse a dans un premier temps été écrite comme résultant d'une part de l'activation de gènes, dit de classe I, impliqués dans la transduction du signal, à l'origine de la survie et de la prolifération cellulaire comme les mutations activatrices de FLT3, KIT ou RAS. Et d'autre part, de la mutation de gènes, dit de classe II, affectant les facteurs de transcription à l'origine d'une perturbation du programme de différenciation, comme les réarrangements t(8;21), inv(16) et t(15;17) à l'origine des transcrits de fusion RUNX1/ETO, CBFB/MYH11 et PML/RAR α (*Bacher et al., 2010; Gilliland et al., 2004; Marcucci et al., 2011*). Ce modèle s'est implémenté par la mise en évidence ces dernières années du rôle leucémogène d'anomalies participant à la régulation épigénétique, au contrôle de l'apoptose et plus récemment à l'équilibre métabolique. L'ensemble de ces éléments aboutit à un modèle de la leucémogénèse multifactoriel qui explique l'hétérogénéité clinique et biologique de ces pathologies.

1.3.2 Dérégulation de la survie et de la prolifération

Les récepteurs tyrosine kinase (RTK), les éléments de la famille RAS, les cascades d'activation PI3K/AKT et RAF/MEK/ERK, sont les principaux intervenants du réseau de signalisation cellulaire ayant été identifiés comme dérégulés en raison de mutations

activatrices induisant un gain de fonction, ou d'une perturbation de leurs molécules régulatrices.

Les RTK permettent la transduction du signal du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire après fixation de leurs ligands, principalement des facteurs de croissance, hormones ou cytokines. Parmi ces RTK, les altérations de FLT3 et KIT sont les mieux décrites.

- *FMS like tyrosine kinase 3 (FLT3):*

FLT3 est nécessaire à la prolifération des progéniteurs précoces. Après liaison de son ligand, FLT3 se dimérise, ce qui conduit à une autophosphorylation du domaine kinase et ainsi l'activation en cascade de la voie PI3K/AKT et de RAF activant à son tour la voie RAF/MERK/ERK (*Fig. 2*). Deux mutations sur des domaines fonctionnels ont été identifiées pour FLT3. La première, sur un domaine ayant un rôle dans l'auto-inhibition (domaine juxta-membranaire, exon 14 et 15) se caractérise par une duplication en tandem, d'où le nom de FLT3-ITD (*internal tandem duplication*). Cette mutation conduit à une dimérisation et une autophosphorylation du récepteur et donc à son activation indépendante de la présence de ligand. La seconde, FLT3-TKD (tyrosine kinase domain), moins fréquente, est caractérisée par une mutation ponctuelle (insertion ou délétion) sur la boucle d'activation du domaine tyrosine kinase (*Yamamoto et al., 2001*). Il a été également montré dans certains cas une surexpression de FLT3 probablement liée à une activité autocrine ou paracrine stimulée par son ligand (*Zheng et al., 2004*). Des anomalies de régulation négative liée à l'inactivation de la CBL ubiquitine ligase responsable de l'internalisation et la dégradation de FLT3 (*Caligiuri et al., 2007*) (*Fig. 2*) ont été également rapportées.

Bien que les différents types de mutation identifiés soient tous activateurs de FLT3 et confèrent un avantage de croissance aux progéniteurs, tous n'agissent pas de la même façon sur la signalisation. Ceci est illustré par le fait que tous n'induisent pas l'activation de STAT5 (*Rocnik et al., 2006*), pouvant ainsi expliquer les différences cliniques constatées.

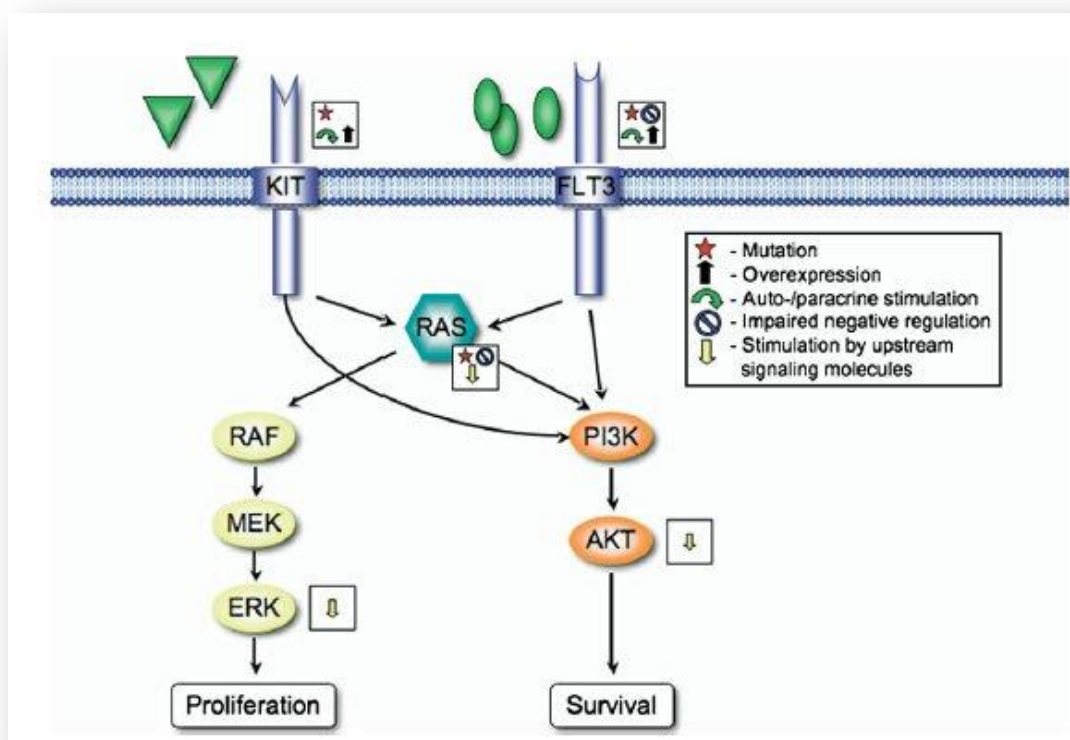


Figure 2. Dérégulation de la transduction du signal dans les LAM.

(Scholl et al., 2008)

- Récepteur c-Kit :

Le second grand récepteur tyrosine kinase impliqué est c-Kit (CD117). Nécessaire à la prolifération et la survie des cellules souches hématopoïétiques et des progéniteurs engagés, son ligand est le *stem cell factor* (SCF). c-Kit fonctionne comme FLT3 par dimérisation puis autophosphorylation stimulant la transduction du signal (Lemmon et al., 1997) (Fig. 2). Exprimé dans 80 à 90% des LAM (Schwartz et al., 1999), il est caractérisé par une activation constitutive. Cette activation peut être le fruit d'une mutation (délétion ou substitution) soit sur le domaine responsable de la dimérisation qui devient alors spontanée (Kohl et al., 2005; Lemmon and Ferguson, 2007), soit sur la boucle d'activation (petite insertion ou substitution) comme par exemple au niveau du codon de D816 induisant l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT et STAT3 (Ning et al., 2001a; Ning et al., 2001b). Comme pour FLT3, il a été décrit une phosphorylation constitutive de c-Kit liée à une stimulation autocrine ou paracrine de

SCF. Cependant bien que plusieurs systèmes de régulation de c-Kit existent, aucune dérégulation de ceux-ci n'a été mise en évidence dans le processus de leucémogénèse.

- RAS:

Les protéines RAS sont des protéines de signalisation intermédiaire, intervenant dans l'ajustement du signal de transduction en aval des RTK. La conformation active de RAS liant le GTP, joue un rôle central en activant les voies PI3K/AKT et RAF/MEK/ERK (*Fig. 2*). Son activation aberrante conduit ainsi à favoriser survie et prolifération. L'activation excessive est soit liée à l'augmentation de signalisation via les RTK précédemment décrits, soit liée à des mutations non-sens qui suppriment l'activité GTPase régulatrice (*Van Meter et al., 2007*). On retrouve les mutations NRAS et KRAS dans 10 à 14% des LAM (*Bacher et al., 2006*).

Contrairement aux tumeurs solides, les perturbations directes des éléments des cascades de signalisation RAF et PI3K ou de leurs régulateurs sont rares ou encore non identifiées. On a donc une très grande hétérogénéité des anomalies moléculaires mais un nombre plus restreint de voies de signalisation dérégulées.

- Auto-renouvellement:

Le processus d'auto-renouvellement des CSH fait intervenir de nombreux éléments : gènes HOX, voie WNT/ β catenin, axe PTEN/AKT/FoxO, protéine BMI1, groupe des protéines polycomb et les voies NF-kB, IRF-1, DAPK, HIF, mTOR, NOTCH, HEDGEHOG... . Certains de ces éléments sont perturbés ou constitutivement activés dans les CSL. Ainsi les gènes HOX, critiques pour l'hématopoïèse, sont dérégulés dans la majorité des cas de LAM (*Frohling et al., 2007*). Bien que toutes les mutations associées ne soient pas identifiées et la nature de la dérégulation inconnue, on notera l'association de cette dérégulation des gènes HOX au réarrangement du gène *Mixed Lineage Leukemia- Partial Tandem Duplication* (MLL-PTD) dans 5 à 10% des LAM (*Dorrance et al., 2006*). La voie PI3K-AKT-FoxO, qui joue un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire par l'intermédiaire de p21, présente également une activation constitutive dans les LAM. Il en est de même pour la voie WNT/ β catenin (*Simon et al., 2005*).

1.3.3 Perturbation du processus de différenciation

Les processus de blocage de la différenciation sont le plus souvent dus à la répression de gènes nécessaires à ce processus. Ainsi le gène du facteur de transcription *CCAAT enhancer binding protein alpha* (CEBPA), impliqué dans l'engagement cellulaire et la différenciation des progéniteurs myéloïdes vers la lignée granuleuse (plus particulièrement les neutrophiles) est fréquemment réprimé. Les mécanismes sont multiples avec, d'une part des mutations inactivatrices comme pour la mutation non-sens de CEBPA au niveau N-terminal qui donne une protéine tronquée non fonctionnelle, ou la mutation C-terminale qui conduit à une absence de liaison à l'ADN ou une dimérisation de la protéine. A noter que pour CEBPA, le nombre d'allèles mutés semble impacter le pronostic des patients. Le défaut de différenciation peut être également la conséquence d'une répression des facteurs de transcription par des protéines oncogéniques comme notamment décrit avec les protéines de fusion RUNX1-ETO ou PML-RARA, fruits des translocations t(8;21)(q22;q22) et t(15;17)(q22;q12) respectivement (*Rosenbauer and Tenen, 2007*), ou encore dans la leucémie myélomonocytaire à éosinophile (M4Eo de la classification FAB) où l'inversion au chromosome 16 (Inv(16)(p13q22)) résulte en la fusion des gènes CBFβ and MYH11 ayant pour conséquence l'absence de formation d'un complexe de transcription par séquestration du CBFα2 dans le cytoplasme (*Kundu and Liu, 2001*).

1.3.4 Processus d'échappement à la mort cellulaire

L'une des voies de signalisation différenciellement activée entre CSH et CSL est la voie du *Nuclear Factor-κB* (NF-κB). Cette voie induit des signaux de croissance, de survie cellulaire et enfin d'invasion cellulaire au détriment du processus apoptotique. Elle a été identifiée comme étant activée dans les cellules CD34⁺ leucémiques (*Guzman et al., 2001*). In vitro, grâce à des inhibiteurs directs ou indirects de NF-κB, on a pu déclencher l'apoptose des CSL CD34⁺ par induction d'une réponse apoptotique via l'activation de p53, tout en préservant les CSH soulignant son importance physiopathologique. Cette réponse était accompagnée de conditions pro-oxydantes notamment une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (*Guzman et al., 2005*).

1.3.5 Autres anomalies génétiques

- Nucleophosmin (NPM1):

NPM1 est une phosphoprotéine du noyau impliquée dans la synthèse ribosomale, la réponse au stress, le maintien de la stabilité génomique et la régulation de l'activité et de la stabilité de gènes suppresseurs de tumeurs tel que p53 ou ARF (*Schlenk and Dohner, 2009*). La mutation de l'exon 12 conduit à une anomalie de répartition avec une localisation majoritairement cytoplasmique. Cette mutation est présente dans 24 à 35% des LAM (*Falini et al., 2007*).

- ETS-Related Gene (ERG) et Brain and acute leukemia cytoplasmic gene (BAALC):

ERG est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la prolifération et de la différenciation. Issu de plusieurs réarrangements chromosomiques dont t(16;21)(p11;q22) avec la protéine de fusion FUS-ERG et t(X;21)(q25-26;q22) avec ELF4-ERG, son implication est suspectée dans la leucémogénèse myéloïde et lymphoïde.

De même BAALC, surexprimé dans les LAM avec trisomie 8, d'expression variable chez les patients de caryotype normal et dont le rôle de la protéine codée est inconnu, est suspecté d'être impliqué dans le même processus que ERG. D'autant plus que pour des cellules hématopoïétiques saines, une surexpression de BAALC est retrouvée aux stades précoces des progéniteurs puis décroît lors de la différenciation (*Baldus and Bullinger, 2008*).

- Meningioma 1 gene (MN1):

Impliqué dans la translocation t(12;22)(p13;q11) avec la protéine de fusion MN1-TEL, le gène MN1 est capable (en association avec d'autres oncogènes) d'induire une LAM dans un modèle murin. Ce phénomène est lié à sa capacité à induire l'auto-renouvellement des progéniteurs et à bloquer la différenciation.

- Anomalie chromosomiques:

Les LAM sont également caractérisées par de multiples anomalies chromosomiques, cependant les conséquences moléculaires et leur impact sur le processus tumoral n'est pas toujours bien identifié. Ainsi, la délétion 17p est associée à la mutation du gène TP53, codant p53 et contribuant de ce fait à l'instabilité génétique et à l'accroissement de la survie cellulaire (*Christiansen et al., 2001*). La délétion 17q est associée à des altérations du gène NF1 et celle de 5q31 est associée au gène CTNNA1 codant l' α -catenine. L'amplification de 11q23-24 est associée aux gènes ETS1, FLI1, DDX6 et MLL et celle de la région 11q13.5 est associée au gène GAB2. Quant à l'amplification de la région 13q12, elle est associée aux gènes FLT3, FLT1, PAN3 et CDX2. CDX2 code notamment les régulateurs de la voie HOX dont la surexpression a été identifiée chez les patients présentant un caryotype normal ou présentant les translocations t(9;11), t(15;17), t(8;21) ou inv(16).

1.3.6 Anomalies épigénétiques

Comme la plupart des tumeurs solides les LAM présentent des altérations épigénétiques. Les recherches dans ce domaine se multiplie depuis peu et laisse penser que tout comme pour les altérations génétiques il existe une hiérarchisation d'altération épigénétiques participant au processus de leucémogénèse (*Conway O'Brien et al., 2014; Gutierrez and Romero-Oliva, 2013*). Les mécanismes de régulation épigénétiques les plus étudiées sont la méthylation des cytosines de l'ADN ayant une action répressive sur les gènes, et la modification des histones, à la base de la composition de la chromatine. Ces histones peuvent être acétylées par les histones acétyltransferases (HAT), ce qui est associé à une activation transcriptionnelle, ou bien désacétylées par les histones désacétylases (HDAC) conduisant à une répression transcriptionnelle. La conséquence de la méthylation des histones ne peut être généralisée car dépendante du lieu de méthylation. Etant donné qu'il est estimé que 8,3% des îlots CpG présentent une dérégulation de méthylation, cela correspond à un potentiel d'au moins 2000 gènes réprimés dont l'impact sur la leucémogénèse reste à déterminer.

Introduction

La première altération identifiée fut celle de la méthylation en 5' du gène de la calcitonine. Une décroissance, du niveau global de 5-méthylcytosine lors de la rechute a été mise en évidence, suggérant un rôle dans la résistance thérapeutique (*Plass et al., 2008*). Dans un génome leucémique globalement hypométhylé (*Costello and Plass, 2001*), certains gènes se distinguent car hyperméthylés et donc réprimés. Ce sont des gènes suppresseurs de tumeurs ayant un rôle dans le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou l'apoptose (*Plass et al., 2008*). L'exemple le mieux décrit est celui de TET2 (Ten-eleven translocation 2), une dioxygénase α -cétoglutarate et fer-dépendante, qui hydroxyle les 5-méthylcytosines et donc participe à la déméthylation de l'ADN. Les mutations directes de TET2, ou celles des IDH qui indirectement répriment l'activité de TET2 par la production de 2-hydroxyglutarate au lieu d' α -cétoglutarate, conduisent à un phénotype d'hyper-méthylation qui perturbe la différenciation myéloïde (*Figueroa et al., 2010*).

Ces altérations peuvent être la conséquence d'un certain nombre des altérations géniques décrites précédemment. C'est ce qui est suggéré avec la découverte d'une capacité des protéines de fusion dont PML-RARA et RUNX1-ETO à recruter les *DNA méthyltransférases* (DNMT) et les *histone désacétylases* (HDAC) (*Di Croce et al., 2002; Liu et al., 2005a*). Une mutation inactivatrice du gène codant l'ADN méthyltransferase 3A (DNMT3A) est retrouvée dans 20% des LAM à caryotype normal. Les mutations de gènes comme ASXL1, impliqué dans la régulation épigénétique, ont été rapportées à des modifications d'histones. De même la protéine MLL présente un domaine liant l'ADN correspondant à une activité méthyltransférase qui est perdue dans certaines protéines de fusion dont fait partie MLL mais pas la plus fréquemment rencontrée MLL-PTD. Pourtant dans les deux cas cela aboutit à une perturbation des gènes HOX.

Enfin, certaines anomalies d'expression de microARN ont été associées à des anomalies moléculaires sans que l'on ne connaisse l'impact physiopathologique sur les LAM. Ainsi, les patients présentant la mutation FLT3 ITD montrent une surexpression de miR-155 et ceux présentant la mutation NPM1 ont une surexpression de miR-10a, miR-10b, miR-196a et une sous-expression de miR-204 et miR-128.

1.3.7 Anomalies métaboliques

Des travaux récents ont souligné que certaines de ces mutations moléculaires pouvaient modifier l'équilibre métabolique des cellules leucémiques favorisant la prolifération au détriment de la différenciation. Un exemple très significatif est celui des mutations somatiques affectant les *isocitrate déshydrogénases* (IDH) 1 ou 2 dans certaines LAM. Ces mutations, initialement observées dans les gliomes, induisent la production de *2-hydroxyglutarate* (2HG) au détriment d' α -cétoglutarate (KG). Comme mentionné précédemment ce changement est associé, entre autres, à un phénotype d'hyper-méthylation de l'ADN par diminution de l'activité de l'enzyme TET2, en raison de la capacité du 2HG à inhiber cette enzyme. Ceci a pour conséquence d'impacter la différenciation hématopoïétique normale tout en favorisant le processus leucémique (Figueroa *et al.*, 2010). Récemment, Losman *et al.*, ont confirmé *in vitro* que l'énantiomère (R)-2HG induit la transformation leucémique par sa capacité d'onco-métabolite à favoriser la croissance indépendamment de la présence de cytokines, et le blocage de la différenciation induit par l'Epo. L'inhibition de la production de (R)-2HG montre une réversibilité de l'effet induit (Losman *et al.*, 2013). L'altération de la fonction enzymatique normale des IDH1/2 s'accompagne d'une réduction de synthèse du glutathion, secondaire à l'augmentation de la consommation de NADPH en raison de la production de 2HG, l'ensemble diminuant les capacités anti-oxydantes des cellules (Hole *et al.*, 2011) (Fig. 3).

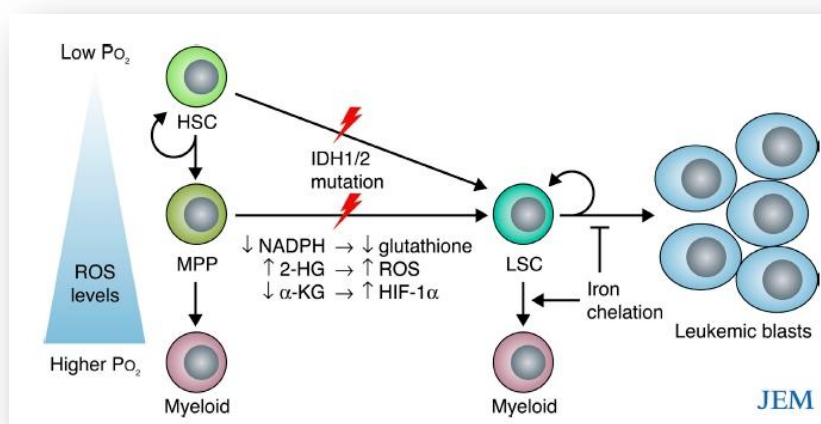


Figure 3. Impact des mutations IDH, des ERO et de la carence en fer sur les cellules souches leucémiques. (Abdel-Wahab and Levine, 2010)

La production des ERO semble également impliquée à plusieurs niveaux dans la leucémogénèse. Il a été observé une augmentation des ERO au sein des cellules leucémiques. Le niveau d'ERO est plutôt faible chez les CSH mais nécessaire car ce sont des signaux d'activation de la différenciation à certaines étapes, permettant une sortie de l'état de quiescence avec une réduction de l'auto-renouvellement. Ce processus active la voie AKT et les facteurs de transcription FoxO (*Hole et al., 2011*).

Cette élévation des ERO a été mise en lien dans certain cas avec des anomalies moléculaire identifiées. Il a été notamment constaté que les cellules CD34⁺ exprimant la mutation RAS présentaient un excès de production d'ERO via l'activation de NOX2, une NADPH oxydase (*Hole et al., 2010*). Il en est de même avec la mutation FLT3-ITD. Cela suggère que ces perturbations de l'équilibre redox des cellules peuvent participer à la progression leucémique, ainsi que les nombreux dommages cellulaires (exemple: cassures de l'ADN) que les ERO peuvent induire. Ceci favorise un environnement propice à la génération de clones dont certains peuvent acquérir un avantage prolifératif. Les conditions sensiblement pro-oxydantes conduisent généralement à la mort cellulaire, mais les modifications géniques et autres présentes dans les clones leucémiques perturbent cette évolution et permettent la survie et la prolifération. De plus, il a été démontré que l'induction d'une carence en fer favorisait, de manière temps et concentration dépendante, le retour à la différenciation, notamment vers la voie monocyttaire (*Fig. 3*). Or cette chélation du fer peut, selon les conditions, générer une augmentation des ERO qui est responsable de cette réactivation de la différenciation entre autre par l'activation de c-Jun N-terminal kinase (Jnk) (*Abdel-Wahab and Levine, 2010*).

1.4 Aspect clinique

Les signes cliniques des LAM sont généralement divers et non spécifiques. Ces signes sont le résultat de l'accumulation des clones cellulaires immatures dans la moelle réduisant le nombre de cellules saines fonctionnelles. Ainsi la cytopénie résultante est à l'origine des signes d'anémie (fatigue, dyspnée, palpitations, pâleur) par la diminution des globules rouges, des signes hémorragiques (épistaxis, saignement

gingival, ménorragies, pétéchies, saignements gastro-intestinaux...), par la diminution des plaquettes, et des signes infectieux par la neutropénie. L'hyperleucocytose peut induire des signes d'hyperviscosité de type maux de tête, détresse respiratoire, confusion, perturbations visuelles ou cérébrales. Adénopathie et splénomégalie sont rencontrées chez la moitié des patients. Les autres signes cliniques retrouvés au diagnostic peuvent être liés à une infiltration de différents tissus (système nerveux central, peau, ganglions, foie, tissu gingival...).

1.5 Diagnostic biologique

Le diagnostic biologique repose sur la combinaison de plusieurs disciplines : la cytologie, la cytochimie, la cytogénétique et l'immunophénotypage.

1.5.1 Cytologie et cytochimie

La cytologie par l'identification morphologique des cellules leucémiques ou cellules blastiques au microscope après coloration au May-Grunwald-Giemsa (MGG), reste la méthode de choix lors du primo-diagnostic sur le sang. La présence de blastes doit être confirmée sur un prélèvement médullaire (le myélogramme) qui permettra de poser le diagnostic de leucémie aigüe en cas d'envahissement médullaire supérieur à 20% de blastes. Les recommandations suggèrent d'énumérer 500 cellules à partir d'un prélèvement médullaire, permettant ainsi d'établir une classification morphologique reflétant le degré de différenciation et le niveau d'engagement dans les différentes lignées hématopoïétiques. Les blastes, cellules immatures, correspondent à des cellules de taille moyenne à grande avec une chromatine nucléaire finement mottée, et généralement un ou plusieurs nucléoles. Le cytoplasme des myéloblastes contient de fines granulations azurophiles, avec ou sans corps d'Auer.

Cette identification cytologique est couplée à des techniques de réactivité cytochimique, critère d'orientation vers une lignée. Parmi ces réactions, on retrouve la réaction des *myéloperoxidases* (MPO), la réaction au Noir Soudan, ou les réactions des *α -naphthyl acétate estérases* (NASDA) et des estérases non spécifiques (butyrate estérase). On caractérise ainsi par une différenciation myéloïde une réaction MPO positive présente chez au moins 3% des blastes. L'absence de MPO n'exclue pas une

Introduction

morphologie myéloïde en raison d'un manque de MPO chez les myéloblastes et monoblastes précoces. La réaction au Noir Soudan présente la même caractérisation mais de façon moins spécifique. Les monoblastes et monocytes sont caractérisés par la réaction des estérases non spécifiques, et les granuleux et monocytes par la réaction NASDA. La cytochimie reste cependant une méthode d'une certaine variabilité, qui doit toujours être confirmé par un immunophénotypage.

En raison de la variabilité du degré d'engagement et de différenciation des cellules leucémiques dans les différentes lignées, une première classification, définie par neuf sous-groupes morphologiques et leurs résultats cytochimiques correspondant, a été élaborée en 1976 (*Bennett et al., 1976*), puis révisée en 1985 (*Bennett et al., 1985*). Cette classification cytologique de l'hétérogénéité des LAM porte le nom des trois nations ayant participées à son élaboration : classification FAB pour *French-American-British group* (Table I). Ce système définissait l'hémopathie rencontrée comme étant une LAM dès la présence de plus de 30% de blastes dans la moelle.

Table I. Classification FAB des leucémies aigües myéloblastiques
(*Smith et al., 2004*)

Classification FAB		
Catégorie	Dénomination	Incidence
M0	LAM avec différenciation minimale	3%
M1	LAM sans maturation	15-20%
M2	LAM avec maturation	25-30%
M3	Leucémie aiguë promyélocytaire	5-10%
M4	Leucémie aiguë myélomonocytaire	25-30%
M4Eo	Leucémie aiguë myélomonocytaire avec éosinophiles pathologiques	5-10%
M5	Leucémie aiguë monocytaire	2-10%
M6	Erythroleucémie	3-5%
M7	Leucémie aiguë mégacaryocytaire	3-12%

Avec l'émergence de nouvelles techniques, la cytogénétique, la biologie moléculaire et l'immunophénotypage, un certain nombre d'informations a été apporté sur ces LAM. Et ainsi certaines anomalies génétiques se sont révélées spécifiques de certains types de LAM, permettant également de distinguer de nouveaux sous-groupes de patients avec une réponse au traitement et un pronostic distincts.

Ainsi au début des années 2000, une nouvelle classification fut établie par l'organisation mondiale de la santé : classification WHO (*World Health Organisation*). Cette classification modifie la classification FAB en incluant les anomalies cytogénétiques identifiées et permet ainsi de mettre à jour des LAM représentant une nouvelle entité clinico-biologique. La classification WHO a diminué le seuil de pourcentage de blastes, définissant une LAM à partir de 20% de blastes présents dans la moelle (*Harris et al., 1999*). Elle fut ensuite révisée en 2008 (*Table II*). En pratique, les deux classifications sont utilisées de façon complémentaire.

1.5.1 Immunophénotypage

L'immunophénotypage est une technique complémentaire à la cytologie permettant d'affirmer le caractère immature des cellules et de déterminer la nature des progéniteurs impliqués dans une LAM nouvellement diagnostiquée. En utilisant la cytométrie en flux, plusieurs marqueurs cellulaires (de surface ou cytoplasmique) sont recherchés (*Table III*). Cette technique présente un intérêt particulier pour confirmer l'origine myéloïde (ou non myéloïde) des blastes, lorsque la cytochimie est non informative, voire dans certain cas pour identifier la présence d'une cible thérapeutique possible. Cette technique a permis la reconnaissance de la catégorie LAM-M0 (LAM peu différenciée) et des leucémies de phénotype mixtes (myéloïde et lymphoïde).

Table II. Classification WHO des leucémies aigües myéloblastiques
(Vardiman et al., 2009)

Classification WHO 2008		
Catégorie	Dénomination	Caractéristiques
1er groupe	LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes	LAM avec t(8;21)(q22;q22) ; RUNX1-RUNX1T1 LAM avec t(15;17)(q22;q12) ; PML-RAR α LAM avec inv(16)(p13.1 q22) ; CBF β -MYH11 LAM avec t(9;11)(p22;q23) ; MLLT3-MLL LAM avec t(6;9)(p23;q34) ; DEK-NUP214 LAM avec inv(3)(q21 q26.2) ; RPN1-EVI1 LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13;q13) ; RBM15-MKL1 LAM avec mutation NPM1 LAM avec mutation CEBPA
2ème groupe	LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies	Faisant suite à un syndrome myélodysplasique ou un syndrome myéloprolifératif/dysplasique
		Présentant des anomalies cytogénétiques identiques à celles de myélodysplasies
		Présentant une dysplasie sur plus de 50% des cellules d'au moins deux lignées myéloïdes
3ème groupe	LAM post chimio ou radiothérapie	Une unique entité quel que soit le traitement
4ème groupe	LAM sans spécification particulière	LAM avec différenciation minimale LAM sans maturation LAM avec maturation LA myélomonocytaire LA monoblastique / monocytaire LA érythroblastique LA mégacaryoblastique LAM à composante basophile LAM avec myélofibrose (panmyélose aiguë)
5ème groupe	Sarcome granulocytaire	
6ème groupe	Proliférations myéloïdes associées à la trisomie 21 constitutionnelle	Réaction leucémoïde transitoire
		LAM associée à la trisomie 21 constitutionnelle
7ème groupe	Tumeur blastique plasmocytoïde dendritique	

Introduction

Table III. Expression des marqueurs de surface et cytoplasmique utiles au diagnostic de LAM.
(Dohner et al., 2010)

Expression of markers for diagnoses	
Diagnosis of acute myeloid leukemia (AML)*	
Precursor stage	CD34, CD38, CD117, CD133, HLA-DR
Granulocytic markers	CD13, CD15, CD16, CD33, CD65, cytoplasmic myeloperoxidase (cMPO)
Monocytic markers	Nonspecific esterase (NSE), CD11c, CD14, CD64, lysozyme, CD4, CD11b, CD36, NG2 homologue†
Megakaryocytic markers	CD41 (glycoprotein IIb/IIIa), CD61 (glycoprotein IIIa), CD42 (glycoprotein 1b)
Erythroid marker	CD235a (glycophorin A)
Diagnosis of mixed phenotype acute leukemia (MPAL)†	
Myeloid lineage	MPO or evidence of monocytic differentiation (at least 2 of the following: NSE, CD11c, CD14, CD64, lysozyme)
B-lineage	CD19 (strong) with at least one of the following: CD79a, cCD22, CD10, or CD19 (weak) with at least 2 of the following: CD79a, cCD22, CD10
T-lineage	cCD3, or surface CD3

1.5.2 Cytogénétique

L'analyse cytogénétique fait partie intégrante du diagnostic de LAM avec des anomalies chromosomiques présentes dans environ 55% des cas des LAM de l'adulte (Mrozek et al., 2004) et une classification comprenant désormais une catégorie spécifique pour les anomalies génétiques récurrentes. L'analyse cytogénétique a surtout une valeur pour la classification pronostique des patients depuis que le lien entre des anomalies particulières et des différences significatives de survie entre patients a été déterminée. Ceci a conduit à l'édification d'une classification du risque du patient selon le profil caryotypique, identifiant des sous-groupes de patients de bon et mauvais pronostic et un groupe dit de risque intermédiaire.

Parmi ces multiples anomalies, nous citerons les plus fréquentes telles que les translocations t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q12), t(9;11)(p22;q23) ou t(16;16)(p13,1;q22); les monosomies 7-, 18- ou 17-; les trisomies 8+, 13+, 21+, 22+ et les délétions 5q-, 17p- ou 17q-. Si la majorité des patients présentant des anomalies cytogénétiques ne possèdent que une à deux altérations chromosomiques, 10 à 12 % des patients LAM présentent un caryotype dit complexe avec au moins trois anomalies chromosomiques (définition excluant les translocations t(8;21), t(15;17) et l'inversion du 16). Parmi ces caryotypes complexes, 90% présentent au moins cinq anomalies, avec 55 à 75% présentant une hypoploidie, 25% une hyperploidie, et les quelques pourcents restant présentent une pseudoploidie avec des anomalies structurales, généralement une perte de matériel (exemple: 5q-) qui n'est pas toujours équilibrée

(Mrozek, 2008). L'incidence de ces aberrations augmente avec l'âge du patient et le caractère secondaire de la LAM.

1.5.3 Biologie moléculaire

La plupart des anomalies chromosomiques sont à l'origine d'altérations géniques (réarrangement de gènes, mutations) (*Table IV*) détectables par la technique de fluorescence in situ hybridization (FISH) ou par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Ainsi, on mentionnera, entre autres, les gènes de fusion RUNX1-ETO (dénommé également AML1-ETO) lié à t(8;21), CBFβ-MYH11 lié à inv(16) ou PML-RARα lié à t(15;17), et les nombreuses mutations acquises intervenant dans la physiopathologie comme pour les gènes FLT3, NPM1, CEBPA, MLL, NRAS, WT1, KIT, TET2, IDH, ASXL1, PHF6, DNMT3A...

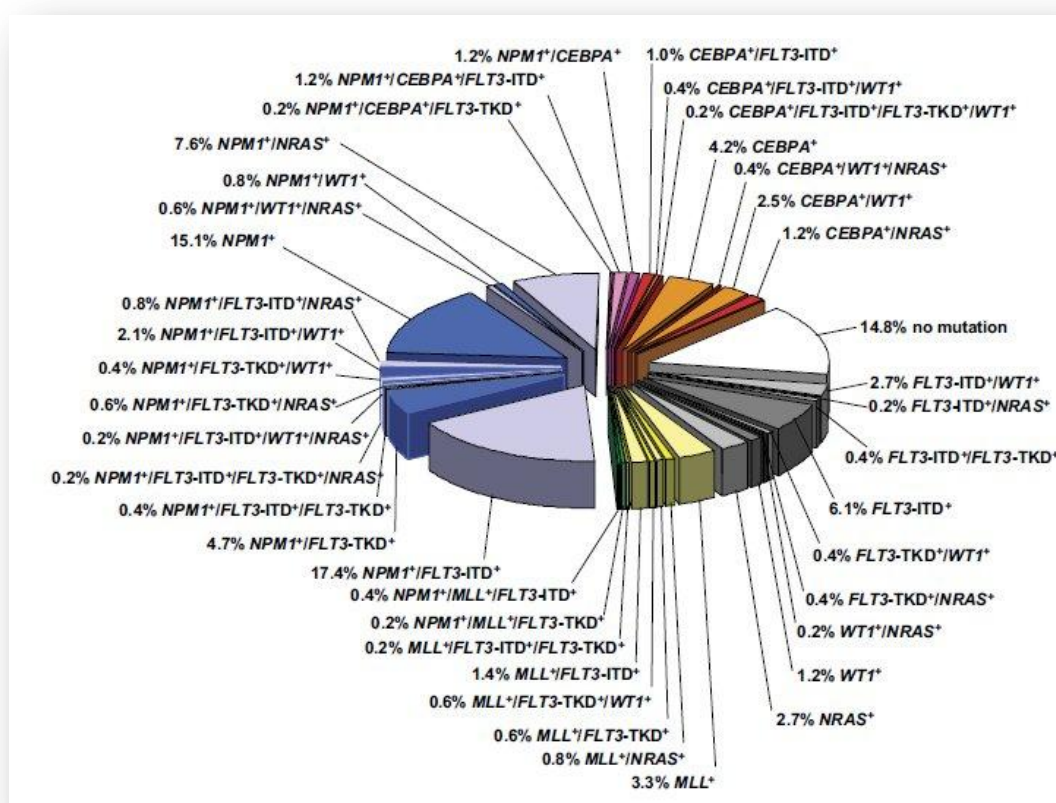


Figure 4. Illustration de la diversité moléculaire des patients sans anomalies caryotypiques.

(Dohner et al., 2010)

Introduction

Certaines mutations coexistent comme celles de FLT3 avec celles de NPM1, et d'autres s'excluent comme les mutations IDH avec celles de TET2. Cette extraordinaire hétérogénéité est illustrée par la *figure 4* donnant la répartition des profils mutationnels pour des patients sans anomalie cytogénétique et ne prenant en compte que les six plus fréquentes mutations.

Table IV. Principales mutations identifiées, anomalies cytogénétiques associées et valeur pronostique. (Ferrara and Schiffer, 2013)

	Approximate frequency in de-novo AML	Frequency in CNAML	Strong associations	Not recorded with	Outlook
NPM1	35%	50%	CNAML, FLT3-ITD, FLT3-TKD, DNMT3A, IDH1, IDH2	CEBPA double mutant	Favourable in patients with CN AML and in elderly patients ²²⁻²⁴
CEBPA	7%	8-19%	CNAML, FLT3-ITD	NPM1	Favourable in patients with CN AML (if biallelic) ^{25,26}
FLT3-ITD	20-25%	30-35%	CNAML, APL, t(6;9), NPM1	...	Adverse in patients with CNAML; could vary with allelic burden; no clear effect in patients with APL ^{27,28}
FLT3-TKD	5%	14%	CNAML, NPM1	...	Controversial ²⁹
KIT	...	25%	Core binding factor leukaemias	Most other karyotypes	Adverse in adult patients with core binding factor leukaemias ^{30,31}
TET2	8-12%	23%	Possibly CNAML	IDH1, IDH2	Controversial ^{32,33}
DNMT3A	14-22%	20-33%	CNAML, NPM1, FLT3	Core binding factor leukaemias, CEBPA, MLL translocations	Possibly adverse in patients with CNAML ³⁴⁻³⁶
IDH1, IDH2	8-16%	30%	CNAML, NPM1, FLT3	TET2, WT1	Controversial ^{37,38}
ASXL1	5-30%	About 10%	Uncommon with NPM1 and FLT3	Possibly CEBPA	Adverse in patients with CNAML and older patients; more common in older patients ³⁹

1.5.4 Analyse à grande échelle

En raison de l'important panel de mutations existant, l'une des nouvelles approches dans les LAM est de réaliser des analyses larges du génome leucémique, afin de déterminer des profils d'expression génique, des profils mutationnels, voire des profils d'expression de microARN. A partir de ces résultats, de nouvelles informations devraient être apportées permettant une meilleure compréhension de la leucémogénèse, l'identification de nouveaux marqueurs pour le diagnostic ou comme facteur pronostique et enfin l'identification de potentielles cibles thérapeutiques.

L'étude de Patel *et al.*, a pu, à l'aide des profils mutationnels, établir des sous-classifications des patients au sein de la classification pronostique selon le caryotype (Patel *et al.*, 2012). Ceci est d'intérêt notamment pour le risque intermédiaire, catégorie la plus hétérogène. Et, d'autre part, selon ces signatures moléculaires, les auteurs ont pu établir quels patients pouvaient voir leur résultat amélioré en intensifiant la dose thérapeutique. D'autres études ont eu recours à l'analyse d'expression génique par puce à ADN afin de classer les LAM. De même, les profils des microARN sont étudiés pour établir de nouvelles sous-classifications et ont déjà montré leur capacité à distinguer LAM et leucémie lymphoïde aigue de témoins sains.

Récemment une première étude protéomique du profil de 121 protéines dans les cellules CD34⁺ leucémiques, les cellules souches leucémiques CD34⁺CD38⁻ et des cellules témoins a démontré la différence des profils protéiques avec notamment 54 protéines sur ou sous-exprimées dans la CSL en comparaison des autres blastes CD34⁺ avec l'espoir qu'au moins une des protéines différenciellement exprimées constitue une cible thérapeutique potentielle afin de détruire la source clonale à l'origine de la leucémie (Kornblau *et al.*, 2013).

Ces analyses à grande échelle ne sont qu'au stade de développement pré-clinique et nécessitent de nombreux essais afin de les valider, mais elles représentent l'une des possibilités d'avenir pour la classification des patients et le développement d'une prise en charge personnalisée.

1.6 Le traitement

Bien que les connaissances sur les LAM aient considérablement évolué ces vingt dernières années, la stratégie thérapeutique et les traitements utilisés ont quant à eux peu changé. La base du traitement est constituée d'une polychimiothérapie lourde dont le protocole varie selon le sous type de la LAM et les facteurs pronostiques du patient.

Dans un premier temps le but du traitement est d'induire une rémission complète du patient, rémission définie par la présence de moins de 5% de blastes dans la moelle, l'absence d'invasion extra-médullaire et un retour à une formule sanguine proche de la normale avec un taux de polynucléaires neutrophiles supérieur à 1 G/l, un taux plaquettaire supérieur à 100 G/l et un taux d'hémoglobine supérieur à 10g/dl (*Cheson et al., 2003*). Dans un second temps le traitement a pour but d'éviter une rechute.

Le premier traitement est dit *traitement d'induction*, et il a pour objectif la rémission complète du patient. Il comprend une ou deux cures de chimiothérapie à base d'une anthracycline, et de la cytosine arabinoside (cytarabine). Parmi les anthracyclines, ce sont la daunorubicine et l'idarubicine qui sont les plus utilisées. De nombreux protocoles existent, on retiendra le protocole le plus répandu, avec l'administration de daunorubicine à 45mg/m²/j de J1 à J3 et de cytosine arabinoside à 100mg/m²/j de J1 à J10 par voie intraveineuse (ou cytosine arabinoside à 100-200mg/m²/j de J1 à J7 en perfusion continue) (*Berman et al., 1991; Wiernik et al., 1992*). Cette phase du traitement induit une phase d'aplasie de 3 à 4 semaines avant une phase de régénération et la rémission. Parmi les patients de moins de 60 ans, 70 à 80% d'entre eux bénéficient d'une rémission complète. Seulement 50% des patients dit âgés (de plus de 60 ans) atteignent cette rémission. Les effets secondaires induits par ce type de traitement sont liés à l'aplasie médullaire. Les risques infectieux et hémorragique sont graves et sont responsables de la mort de 10% des patients durant le traitement d'induction. Les effets les plus fréquemment rencontrés sont les troubles gastro-intestinaux (nausées, vomissements, diarrhées), l'asthénie, l'alopecie et la perte de la fertilité. Il faut noter que ce traitement ne cible pas les blastes spécifiquement, ce qui explique l'aplasie observée.

Introduction

Le second traitement, nommé *traitement de consolidation*, ne peut être alors envisagé qu'après rémission. Trois possibilités s'offrent au patient pour ce traitement, du moins pour le patient jeune. Cela comprend des cures de polychimiothérapie pouvant être similaires à l'induction, une greffe de cellules souches hématopoïétiques allogénique, ou une même greffe mais de nature autologue. La greffe allogénique est à ce jour le traitement le plus efficace et le seul potentiellement curatif en raison de l'effet du greffon contre la leucémie (GVL), mais il existe néanmoins un taux de mortalité de 10 à 25% lié à ce traitement, en particulier à cause de la réaction du greffon contre l'hôte (GVH). Les greffes sont réservées aux patients jeunes, sans co-morbidité, mais la diminution de la toxicité du conditionnement a permis d'élargir l'accès à des patients plus âgés. Afin de maintenir la rémission, un *traitement de maintenance* est établi durant 2 à 3 ans, moins intensif constitué de courtes cures de cytarabine associées à une chimiothérapie orale.

Malheureusement les rechutes constituent la première cause d'échec du traitement. Ces rechutes sont retrouvées principalement dans la première année qui suit la rémission avec une nouvelle atteinte de la moelle osseuse. La prise en charge de ces patients et leurs chances d'atteindre une seconde rémission dépendent de la durée de leur première rémission, de leur âge et des caractéristiques cytogénétiques.

Même si la chimiothérapie non ciblée a énormément progressé par la réduction des effets indésirables, une meilleure adaptation des posologies et une meilleure gestion des complications, elle semble tout de même atteindre ses limites.

Les découvertes des altérations génétiques et moléculaires dans les LAM ont ouvert la voie à de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. L'avenir du traitement des LAM repose sur notre capacité à traiter les patients spécifiquement en fonction du panel de mutations identifiées, par des thérapies dites ciblées. Cependant les LAM résultent de multiples anomalies génétiques ou épigénétiques, ce qui signifie que cibler une seule altération risque d'être insuffisant pour éradiquer le clone leucémique. L'association de plusieurs thérapies ciblées ou avec la chimiothérapie conventionnelle semble indispensable.

Ainsi, à l'heure actuelle, on retrouve parmi les nouvelles thérapeutiques en évaluation dans des essais cliniques de phase III, les inhibiteurs de FLT3, les agents déméthylants et un anticorps anti-CD33. Midostaurin, lestaurtinib et sunitinib sont des inhibiteurs de FLT3 en évaluation comme agents de monothérapie dans les rechutes de LAM avec mutation FLT3, et en association avec les traitements d'induction et de consolidation classique dans les LAM de l'adulte jeune avec mutation FLT3. Le taux de réponse chez ces patients semble prometteur. Azacitidine et decitabine sont des agents thérapeutiques déméthylants ayant déjà obtenu l'autorisation de mise sur le marché pour les myélodysplasies et pour les LAM du sujet âgé avec 20 à 30% de blastes en ce qui concerne l'azacitidine. L'évaluation dans d'autres cas de LAM est en cours.

1.7 Pronostic

L'hétérogénéité morphologique et génétique des LAM se retrouve dans l'importante variation de réponse des patients aux thérapies. Le taux de rémission complète est estimé entre quarante à quatre-vingt pour cent en fonction de la population étudiée, témoin de l'hétérogénéité clinique. Une chose est sûre : en l'absence de traitement, les LAM sont fatales en quelques semaines. Un certain nombre de facteurs pronostiques ont été identifiés pour définir la probabilité d'atteindre une rémission complète, le risque de rechute ou la survie globale.

1.7.1 Les facteurs pronostiques cliniques

- L'âge :

Plus l'âge du patient est avancé, plus le pronostic s'avère mauvais en termes de survie mais également de réponse au traitement. Cela en raison de la diminution de la capacité du patient à tolérer la chimiothérapie, mais également par l'accumulation plus importante d'anomalies cytogénétiques dans le clone.

- La réponse au traitement :

Le délai de réponse à la phase d'induction de la chimiothérapie doit être pris en compte pour la suite de la stratégie thérapeutique.

- Le contexte :

Les LAM secondaires à une hémopathie ou un traitement par chimiothérapie sont associées à une diminution du taux de survie et de la probabilité de rémission complète.

1.7.2 Les facteurs pronostiques biologiques

- Cytogénétique :

Les anomalies cytogénétiques observées constituent les principaux facteurs pronostiques définissant des sous-groupes cliniques différents pour les 50% de patient présentant des anomalies cytogénétiques qualitatives ou quantitatives. Les trois catégories de risque sont définies par un pronostic favorable, intermédiaire ou défavorable.

Ainsi, 25% des patients dont le caryotype est anormal présentent des anomalies favorables en terme de pronostic, cela inclut les translocations t(15;17), t(8;21) et inv(16). Ces anomalies sont associées à un taux de survie à 5 ans de 65% et un taux de rémission complète de 90% (*Smith et al., 2004*). Si d'autres anomalies défavorables sont présentes, le pronostic reste favorable (*Grimwade et al., 1998*).

Les anomalies de la catégorie "risque défavorable" comprennent les délétions du chromosome 7 (7-), du chromosome 5 (5-), du bras long q du chromosome 5 (5q-), les translocations t(9;22), t(4;11) ou t(1;19) en association avec d'autres anomalies, les monosomies et les caryotypes complexes c'est à dire présentant au moins trois anomalies (cinq dans certains essais cliniques) à l'exception des translocations t(8;21), t(15;17) et t(16,16). Cela représente 10% des patients avec un caryotype anormal, généralement des patients plus âgés ou des LAM secondaires. La survie à 5 ans chute alors à 10%.

Le reste des patients (50 à 60%) sont dits de pronostic intermédiaire, la majorité d'entre eux ayant un caryotype normal. Leur pourcentage de survie à 5 ans est alors estimé à 30-40% et le taux de rémission complète à 80%.

Introduction

Les 40 à 50% de patients sans anomalie chromosomique (de risque intermédiaire) montrent une grande hétérogénéité clinique. Des valeurs pronostiques des anomalies moléculaires (mutations, changement d'expression) ont tout particulièrement été déterminées pour ce groupe permettant de définir des sous-groupes au sein des LAM à caryotype normal.

- Moléculaire :

La présence de la mutation du gène FLT3-ITD (20-25% des patients) s'avère de mauvais pronostic, surtout si la mutation est homozygote (*Gale et al., 2008; Thiede et al., 2002*). A l'inverse, la mutation de NPM1 présente dans 43 à 62 % des LAM à caryotype normal est associée à un pronostic favorable pour une rémission complète après chimiothérapie d'induction intensive et une survie sans rechute. Ceci n'est pas le cas si, en plus de la mutation NPM1, le patient présente une mutation FLT3 positive (*Schnittger et al., 2005; Thiede et al., 2006*). Les patients avec une mutation de CEBPA sont de pronostic favorable qu'ils aient un caryotype normal ou non (*Schlenk et al., 2008*). A noter, le ratio allélique dans le cas de CEBPA est également facteur pronostique puisque les patients avec une mutation bi-allélique sont de meilleurs pronostique que les mono-alléliques. Enfin, la mutation MLL-PTD, présente chez 5 à 11% des patients de caryotype normal, est associée à une durée de rémission complète plus courte et un taux de survie sans rechute faible (*Schlenk et al., 2008*).

Ainsi, à partir de l'analyse des mutations de FLT3, NPM1 et CEBPA, *Döhner et al.* ont proposé une classification standardisée présentant un intérêt clinique, reprenant et affinant les données des anomalies cytogénétiques, en particulier celles du sous-groupe de pronostic intermédiaire (*Table V*).

Parmi les gènes moins fréquemment altérés des patients LAM, certains ont montré également une valeur pronostique. C'est le cas de WT1, ERG, BAALC, MN1 ou CXCR4.

Le pronostic des patients avec la mutation de *Wilms tumor suppressor gene 1* (WT1) reste incertain bien qu'elle représente 10 à 13% des patients de caryotype normal. Une surexpression du gène ERG est retrouvée chez les patients à caryotype complexe et

donc de mauvais pronostic (*Baldus and Bullinger, 2008*). Caractérisé comme facteur pronostique indépendant, la surexpression de BAALC est associée à un mauvais pronostic avec une diminution de la survie en l'absence des mutations de FLT3, CEBPA ou ERG (*Baldus and Bullinger, 2008*).

MN1 est associé à une faible réponse du patient au traitement d'induction dans les différentes catégories cytogénétiques, de même que sa surexpression chez les LAM à caryotype normal. MN1 a été caractérisé comme facteur pronostique indépendant défavorable pour la survie globale, la survie sans rechute, le taux de rechute et, lors d'une surexpression il est associé à une résistance du traitement par l'*acide tout-trans-rétinoïque* (ATRA) (*Baldus and Bullinger, 2008*).

Toutes LAM confondues, CXCR4 fortement exprimé, est prédictif de résultats thérapeutiques défavorables avec, de plus, un impact négatif sur la survie chez les patients à caryotype normal sans mutation FLT3 (*Baldus and Bullinger, 2008*).

Enfin, l'expression des microARN permet également de définir un pronostic. C'est le cas pour les surexpressions de miR-199a et mi-R191 qui ont un effet négatif sur la survie. Les expressions de miR-9 et miR-let7b ont été corrélées au risque cytogénétique avec l'association d'une faible expression à un risque favorable alors qu'une forte expression est associée à un risque intermédiaire (*Mrozek et al., 2009*).

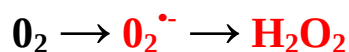
- Autres :

L'augmentation de certains paramètres biologiques est également de mauvais pronostic comme l'élévation des LDH ou l'hyperleucocytose.

L'élévation de marqueurs du stress oxydant tel que le niveau d'ERO, a également été rattaché à un taux de rechute plus important, ce qui fait des ERO un facteur prédictif potentiel (*Zhou et al., 2010*).

2. L'HOMÉOSTASIE DU FER

Le fer est indispensable à la vie des mammifères dont l'Homme. Avec un total d'environ 5g contenu dans l'ensemble de l'organisme humain, ce métal intervient dans des fonctions nombreuses et variées, principalement par sa capacité à échanger des électrons, et ainsi participe à un très grand nombre de réactions enzymatiques basées sur un processus d'oxydoréduction. Dans les milieux biologiques on le retrouvera majoritairement à l'état ferreux Fe^{2+} (forme réduite, fer II) ou à l'état ferrique Fe^{3+} (forme oxydée, fer III). Parmi ses différentes fonctions, on notera par exemple son rôle dans le transport d'oxygène avec 60% du fer total associé à l'hémoglobine, son rôle dans la synthèse d'ADN, son rôle dans la chaîne respiratoire à travers les structures fer-soufre et les cytochromes, ou encore dans le bon fonctionnement des défenses immunitaires (*Nairz et al., 2014*). La part non utilisée est stockée par l'organisme au sein du foie et des macrophages. En l'absence de carence spécifique, l'apport alimentaire journalier est suffisant pour compenser les pertes issues des saignements et de la desquamation (*Cook and Lynch, 1986*). Au niveau cellulaire, un déficit en fer inhibe la croissance et conduit à la mort cellulaire (*Yu et al., 2007; Zhang et al., 2008*). Mais si cet élément est indispensable pour l'organisme, il peut aussi être toxique. En effet, en excès ou mal pris en charge, il peut participer à la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO), dont, par l'intermédiaire de la réaction de Fenton, le composé le plus réactif d'entre elles: le radical hydroxyle ($\text{HO}^\bullet$).



Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et ion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) sont naturellement générés par plusieurs enzymes, et aussi par la chaîne respiratoire, surtout lors de son dysfonctionnement. Toutefois la conversion de ces espèces en radical hydroxyle peut endommager tous les composants cellulaires (ADN, glucides, protéines, lipides) (*Wang and Pantopoulos, 2011*). Ainsi, déficit en fer comme surcharge en fer

impactent le destin cellulaire (survie, prolifération, ou mort) et donc celui de l'organisme (Halliwell, 2007; Sies, 1997; Wang and Pantopoulos, 2011).

2.1 Le trafic du fer chez l'homme

2.1.1 L'absorption

Apporté par l'alimentation (entre 10 et 20 mg par jour), l'absorption de fer est ajustée aux besoins de l'organisme (1 à 2 mg par jour en situation non pathologique). Le fer est absorbé au niveau du pôle apical des entérocytes duodénaux sous deux formes:

- le fer héminique via le transporteur *Heme Carrier Protein 1* (HCP1). Forme de fer apporté par un régime alimentaire carné, son absorption sous cette forme est la plus efficace. Le fer héminique est ensuite libéré du noyau protoporphyrinique par l'action de l'*Hème Oxygénase 1* (HO-1) pour donner la forme inorganique utilisable par la cellule.
- le fer non lié à un cofacteur organique. Apporté par les céréales et les légumineuses, son transport est réalisé par le *Divalent Metal Transporter 1* (DMT1) après réduction de la forme fer III en fer II par la *Duodenal cytochrome b reductase* (Dcytb) (Anderson et al., 2009) (Fig. 6).

Le fer est le métal de transition le plus abondant au niveau intracellulaire, avec le zinc aux propriétés et rôles distincts, et de nombreuses réactions anaboliques l'utilisent (Breuer et al., 2008). Il peut être stocké dans la ferritine (Ft) de l'entérocyte, mais la majeure partie est transférée dans la circulation sanguine après passage du pôle basal de l'entérocyte via l'unique exporteur spécifique connu à ce jour et nommé ferroportine (FPN). Le fer est re-oxydé en Fe^{3+} par l'héphaestine, une ferroxidase cuivre dépendante, avant de se lier à la transferrine (Tf), glycoprotéine de transport du fer dans le sang (Fig. 6). Cette interaction fer-Tf est réversible et permet la fixation maximale de deux atomes de fer ferrique par transferrine.

2.1.2 Distribution, utilisation et recyclage

Ce fer lié à la transferrine est ainsi distribué à l'ensemble des tissus de l'organisme (Hower et al., 2009) après internalisation par l'intermédiaire du récepteur de la transferrine (*Transferrin Receptor 1*, TfR1) par mécanisme d'endocytose (Fig. 6). Ce

Introduction

récepteur peut fixer deux molécules de transferrine simultanément avec une affinité croissante selon la charge en fer.

Le fer libéré à l'intérieur de l'endosome, suite à l'influx de protons et la diminution de pH, est transféré dans le cytoplasme cellulaire après réduction par une ferriréductase NADPH-dépendante de la famille des Steap, par l'intermédiaire du transporteur DMT1. Le DMT1 de l'endosome est une isoforme de DMT1 présente au niveau entérocytaire, contrairement à ce dernier il ne présente pas de régulation post-transcriptionnelle par le système IRE-IRP (décrit au paragraphe 2.2) en raison de l'absence de motif IRE sur son ARN messager.

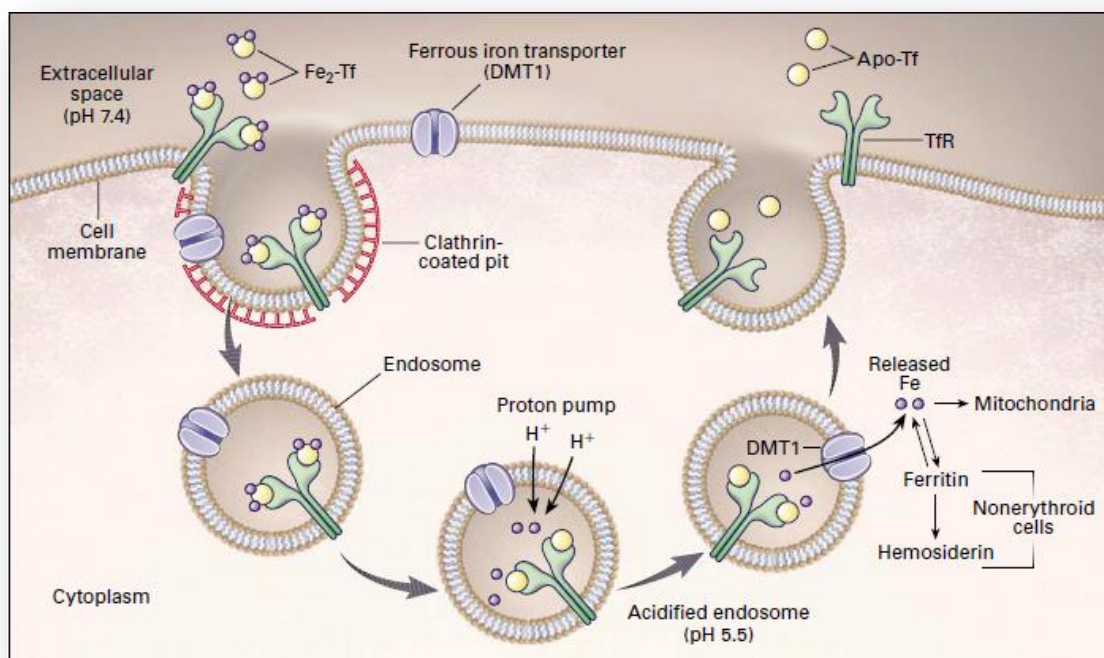


Figure 6. Mécanisme d'absorption du complexe fer-transferrine par endocytose.

(Andrews, 1999)

Au niveau du cytosol et au niveau mitochondrial, le fer est impliqué dans de nombreuses réactions (cycle de Krebs, activité respiratoire, synthèse d'hème) pour le transfert d'électron ou comme catalyseur d'oxydation par des enzymes comme les myéloperoxydases, les cytochromes P450, la ribonucléotide réductase, la catalase... Il est fixé par les chaînes polypeptidiques de certaines métalloprotéines, principalement les protéines à centre fer-soufre et les hémoprotéines.

Introduction

La moelle osseuse est le principal organe consommateur de fer (70%) pour la synthèse de l'hémoglobine érythrocytaire avec la participation de l'enzyme *5-aminolevulinic acid synthase 2* (ALAS2) comme première étape de la synthèse de protoporphyrine IX, le cofacteur qui reçoit le fer par l'enzyme ferrochélatase pour former un hème. La captation du fer via le TfR est donc primordiale pour ces cellules, comme pour la plupart des autres types cellulaires. La concentration en TfR1 est régulée par le niveau de fer, et la pression partielle en oxygène via les facteurs de transcription de réponse à l'hypoxie (*Hypoxia Inducible Factor* - HIF). Le fer non utilisé pour l'érythropoïèse est distribué aux autres tissus, avec une majorité liée à la myoglobine du muscle strié.

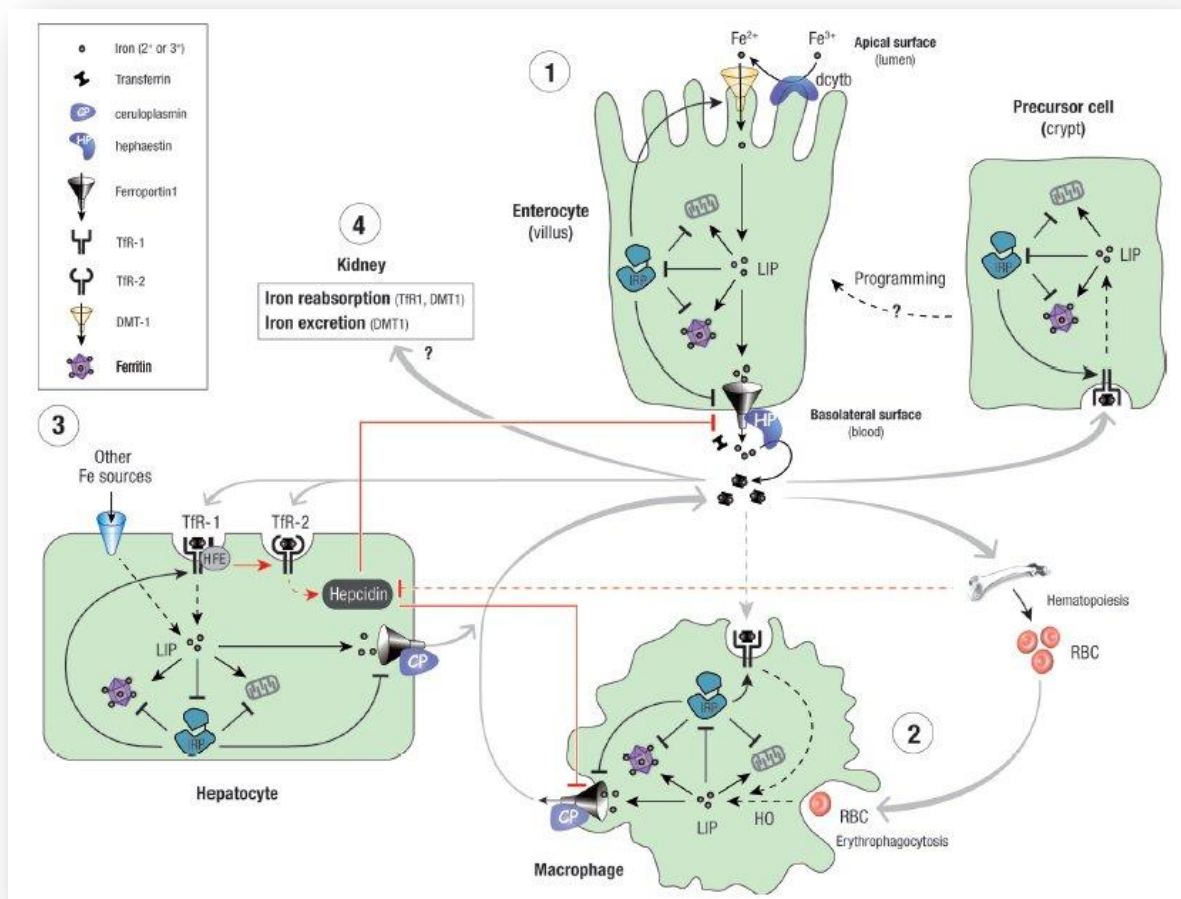


Figure 7. Les flux du fer dans les différents types cellulaires. 1: les entérocytes, 2: les macrophages, 3: les hépatocytes et 4: les cellules rénales. (Muckenthaler et al., 2008)

Le foie constitue l'organe de stockage principal du fer (10-20% chez les sujets sains) sous forme de ferritine (Fig. 7). Chez ferritine se compose de deux sous-unités:

heavy/heart (H) et *light/liver* (L), dont la proportion varie selon le tissu considéré, et donnant une enveloppe sphérique avec une cavité centrale capable de stocker jusqu'à 4500 atomes de fer (2500 atomes en moyenne)(Bomford et al., 1981; Ishitani and Listowsky, 1975).

La capacité d'absorption intestinale journalière est limitée, de l'ordre de quelques milligrammes tout au plus, couvrant les besoins de l'organisme en l'absence de situation pathologique. Au sein de l'organisme, aucun système d'excrétion spécifique du fer n'existe. Cela implique une gestion en circuit quasi-fermé de ce métal et cela passe notamment par un système de recyclage efficace du fer des globules rouges faisant intervenir les macrophages (*Fig. 7*). Les érythrocytes sénescents sont phagocytés par les macrophages (processus d'érythrophagocytose) de la rate et du foie principalement. L'hémoglobine est catabolisée par HO-1 libérant du fer qui est excrété des macrophages par la ferroportine et lié à la transferrine circulante après oxydation par une enzyme similaire à l'héphaestine: la ceruloplasmine. Les réserves de fer hépatique constituent une autre source de fer disponible.

2.1.3 Régulation

Les faibles variations d'import et export de fer, hors hémorragie massive pour celui-ci, au niveau d'un organisme, par l'absence d'import et d'export massifs, imposent l'existence de systèmes de régulation pour éviter les cas de carence ou surcharge dont les conséquences ont été présentées. L'homéostasie du fer est ainsi assurée par deux systèmes complémentaires dont l'activité s'exerce à deux niveaux. D'une part une régulation systémique et d'autre part une régulation ubiquiste au niveau de chaque cellule.

La régulation du fer au niveau systémique est réalisée grâce à l'hormone appelée hepcidine. C'est un peptide produit et sécrété principalement par les hépatocytes (*Fig. 7*) ayant pour cible le seul exporteur cellulaire de fer connu à ce jour, la ferroportine. L'hepcidine cible principalement les plus gros pourvoyeurs de fer à la circulation, à savoir les entérocytes et les macrophages. La liaison de l'hepcidine à la ferroportine induit l'internalisation et la dégradation du complexe par les lysosomes, ce qui a pour

effet d'inhiber la sortie du fer de ces cellules et donc d'induire une rétention du fer intracellulaire, diminuant ainsi l'approvisionnement de fer circulant (*Nemeth et al., 2004*). La régulation transcriptionnelle de l'hépcidine est complexe et sensible à plusieurs stimuli. L'augmentation de la concentration en fer circulant active la synthèse d'hépcidine afin de réduire l'efflux de fer au niveau des entérocytes et diminuer la sortie de fer des macrophages. Réciproquement, un déficit en fer, une situation d'anémie ou d'hypoxie la répriment (*Nemeth and Ganz, 2006*). A noter que l'inflammation impacte aussi l'expression d'hépcidine.

Au niveau cellulaire, il existe pour un grand nombre des espèces moléculaires intervenant dans l'homéostasie du fer des régulations transcriptionnelle et post-transcriptionnelle. La régulation post-transcriptionnelle est assurée par le système IRE-IRP dont la description est détaillée au paragraphe 2.2.

Au niveau transcriptionnel on notera la présence de motifs *Electrophile Response Element* (EpRE) sur les régions codantes de la ferritine et de l'hème oxygénase conduisant en situation de stress à une augmentation de la transcription. Indépendamment, la transcription du récepteur à la transferrine est régulée au cours de la différenciation et de la prolifération cellulaire (*Lok and Ponka, 1999, 2000*) afin d'adapter le besoin en fer de la cellule dans ces étapes où il représente un élément critique. En situation inverse, une séquence de ce gène (CDRE) serait impliquée dans l'inhibition de la transcription en réponse à la densité cellulaire (*Wang et al., 2005*). Enfin, ce même gène serait également régulé lors d'une situation d'hypoxie en raison de la présence en amont de la région codante d'une séquence *Hypoxia Response Element* (HRE) régulée par le facteur de transcription HIF-1 α (*Lok and Ponka, 1999*). A noter qu'indirectement la carence en fer par réduction de l'activité de prolylhydroxylase fer -dépendante conduit également à l'activation de HIF-1 α . Le motif HRE est également présent sur les gènes codant la céruloplasmine, la ferroxidase, la transferrine et l'hème oxygénase et sont donc ainsi surexprimés en situation d'hypoxie ou de carence en fer. Enfin, le processus inflammatoire participe à l'activation de la transcription par l'intermédiaire des cytokines (IL-2, IL-6, TNF- α) pour la ferritine et la céruloplasmine.

2.2 Régulation cellulaire du fer: le système IRE-IRP

L'homéostasie cellulaire du fer implique des *trans*-éléments appelés *Iron Regulatory Proteins* se fixant à des motifs en *cis*, les *Iron Responsive Elements*, des séquences non-codantes des ARN messagers régulés (Wang and Pantopoulos, 2011). Ces éléments constituent le système IRE/IRP.

2.2.1 Structure et fonctionnement

Les *Iron Regulatory Proteins* 1 et 2 (IRP 1, IRP2) sont des protéines cytosoliques, responsables de la régulation intracellulaire du fer en se liant aux *Iron Responsive Elements* (IRE) sur des séquences non traduites de certains ARN messagers. Ce contrôle post- transcriptionnel concerne la traduction de certains gènes décrits plus haut et codant des protéines impliquées dans l'entrée du fer (TfRC, DMT1) dans les cellules, son utilisation (ALAS2, HIF 2 α , aconitase mitochondriale), son stockage (FTH1, FTL) et son exclusion (FPN1a) (Fig. 8) (Wallander et al., 2006). Une régulation similaire d'autres gènes moins directement liés au fer est suspectée, mais généralement moins bien établie (Sanchez et al., 2006; Sanchez et al., 2011). En effet des connexions de ce système régulateur avec des fonctions cellulaires distinctes de l'homéostasie du fer sont illustrées par le fait que certains ARNm portant des IRE et régulés par les IRP n'ont pas de rapport évident ou immédiat avec la prise en charge du fer, comme par exemple les transcrits codant pour CDC14A intervenant dans le cycle cellulaire (Sanchez et al., 2006).

L'importance des protéines IRP dans l'homéostasie du fer a été démontrée à plusieurs reprises par des études sur des souris (exemples: souris *Aco1* ou *Ireb2*) présentant des délétions des gènes codant ces IRP. Les troubles en résultant allant de la perturbation de la concentration en fer intracellulaire jusqu'à l'absence de viabilité du phénotype à l'état embryonnaire.

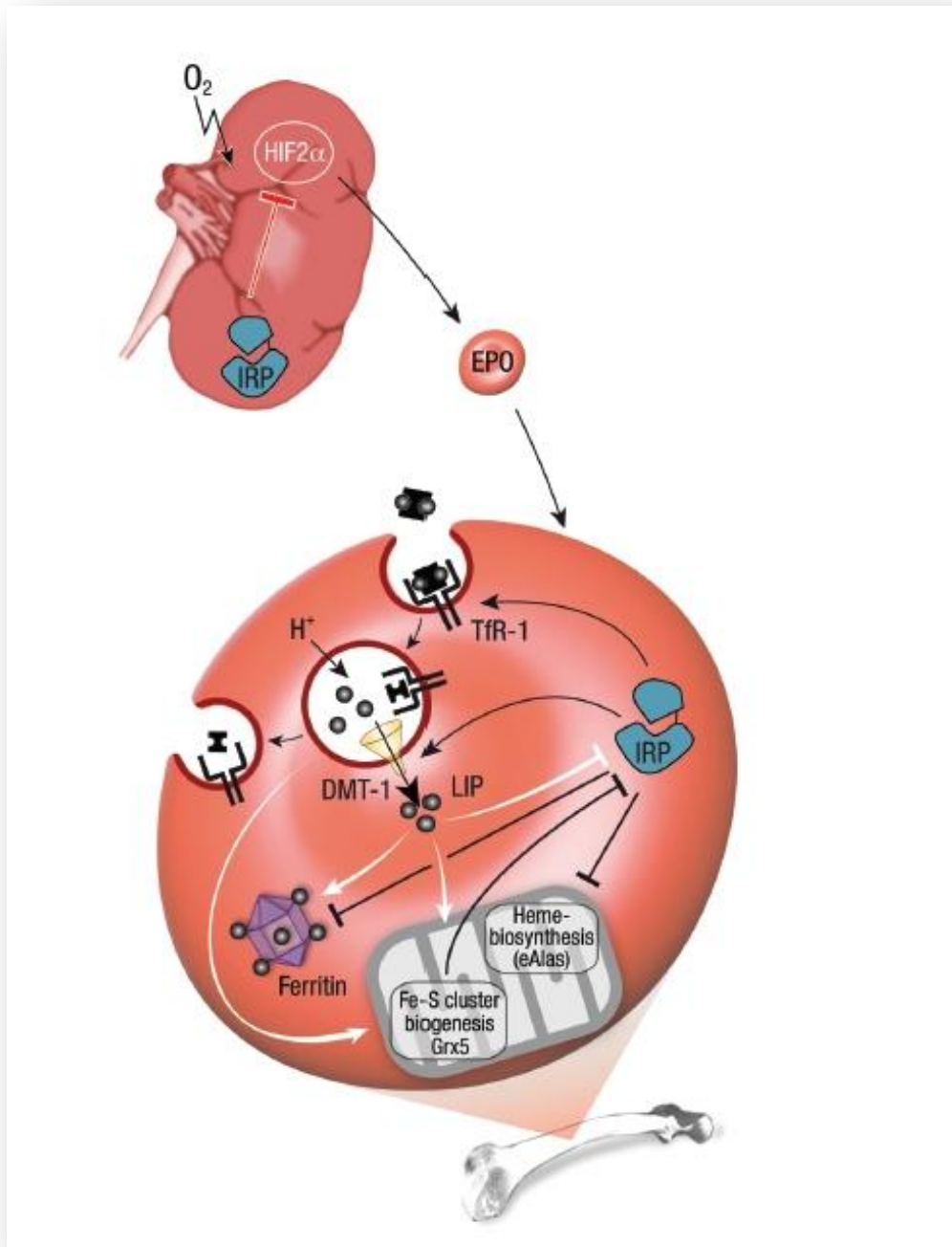


Figure 8. Le fer et son système de régulation IRP/IRE au niveau des érythroblastes.

(Muckenthaler et al., 2008)

Les IRP sont des protéines appartenant à la famille des aconitases. Protéine cytosolique de 98kDa, IRP1 est présente dans tous les tissus avec une proportion importante dans le foie et les reins (Leibold and Munro, 1988; Meyron-Holtz et al.,

2004a). IRP1, sous sa forme d'aconitase cytosolique, présente une activité de conversion réversible du citrate en isocitrate similaire à l'aconitase mitochondriale du cycle de Krebs avec laquelle elle partage une similitude de 30% d'acide aminés. IRP1 contient alors un cluster fer – soufre ([4Fe-4S]) dont trois atomes de fer sont liés par des cystéines et le quatrième fixe le substrat (*Dupuy et al., 2006*). Sous cette forme IRP1 ne peut pas lier les IRE (*Haile et al., 1992*). On retrouve cette configuration de l'holoprotéine lorsque la quantité de fer est suffisante. A l'inverse en situation de carence en fer, le cluster n'est pas assemblé (ou est dissocié) et l'apoprotéine peut lier les IRE. Donc en fonction des disponibilités en fer, et d'autres conditions ou signaux qui modulent l'activité IRP, il existe un équilibre entre les deux formes de la protéine dont la concentration totale varie peu et dont la forme aconitase constitue la configuration prépondérante dans des conditions normales.

IRP2 est également une protéine cytoplasmique de 106kD (*Guo et al., 1994*), elle est retrouvée principalement dans les tissus comme l'intestin, le cœur, les muscles ou le cerveau. Contrairement à IRP1, IRP2 ne présente pas d'activité aconitase bien qu'elle comporte les cystéines nécessaires à l'inclusion d'un centre fer-soufre. Son activité régulatrice par interaction avec les IRE est identique à celle d'IRP1. La façon dont IRP2 est elle-même régulée est différente d'IRP1, car, en présence de fer et d'oxygène, la protéine FBXL5 du complexe SKP1-CUL1-FBXL5 lie le fer par son domaine hémérythrine, ce qui a pour effet de stabiliser le complexe et d'induire l'ubiquitination et la dégradation protéasomale d'IRP2 (*Guo et al., 1995b; Salahudeen et al., 2009; Vashisht et al., 2009*). Cette E3 ubiquitine ligase est donc sensible au fer et la dégradation qu'elle coordonne s'effectue en réponse au statut redox (*Ivan et al., 2001; Zumbrennen et al., 2009*), et d'autres conditions (état de phosphorylation) qui nécessitent d'être clarifiées. Le mode de dégradation d'IRP2 par le protéasome conditionne donc l'activité régulatrice de cette IRP et dépend, comme pour IRP1, de la concentration intracellulaire en fer.

Les IRE sont des structures dites en "épingle à cheveux" (*fig. 9*) disposées dans les régions non codantes des ARN messagers régulés par les IRP. Après fixation des IRP aux IRE, l'effet régulateur sur la traduction de l'ARNm est dépendant de la position des

Introduction

IRE. Les IRE positionnés du côté 5' de la région codante (exemple: ARNm des sous-unités L et H de la ferritine) inhibent la traduction, alors que les IRE positionnés en 3' de l'ARNm (exemple: ARNm du récepteur à la transferrine) protègent l'ARNm des ribonucléases et ainsi maintient un niveau de traduction élevé (Fig. 10).

L'ARNm du récepteur à la transferrine possède la particularité de posséder cinq IRE en position 3' (Casey et al., 1988). La présence d'un minimum de trois semble nécessaire pour maintenir une régulation par les IRP (Casey et al., 1989). A ce jour aucune autre cible du système IRE/IRP ne semble posséder plusieurs IRE.

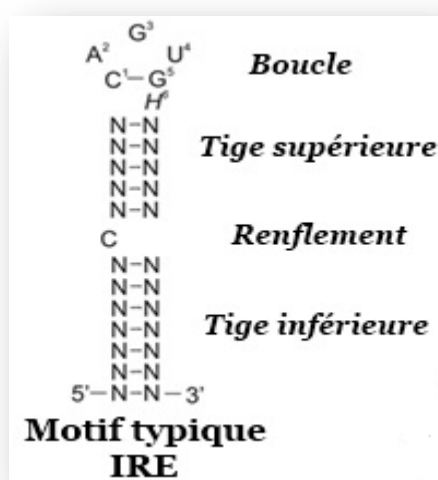


Figure 9. Structure secondaire du motif IRE.
(Recalcati et al., 2010)

La régulation de DMT1 ou FPN1a en réponse au fer n'est pas complètement caractérisée à ce jour. Elle semble dépendante du tissu considéré (Abboud and Haile, 2000; Gunshin et al., 1997). La régulation de ces deux protéines passe probablement par plusieurs mécanismes en raison notamment de l'existence d' isoformes de DMT1 et FPN1a dépourvus d'IRE.

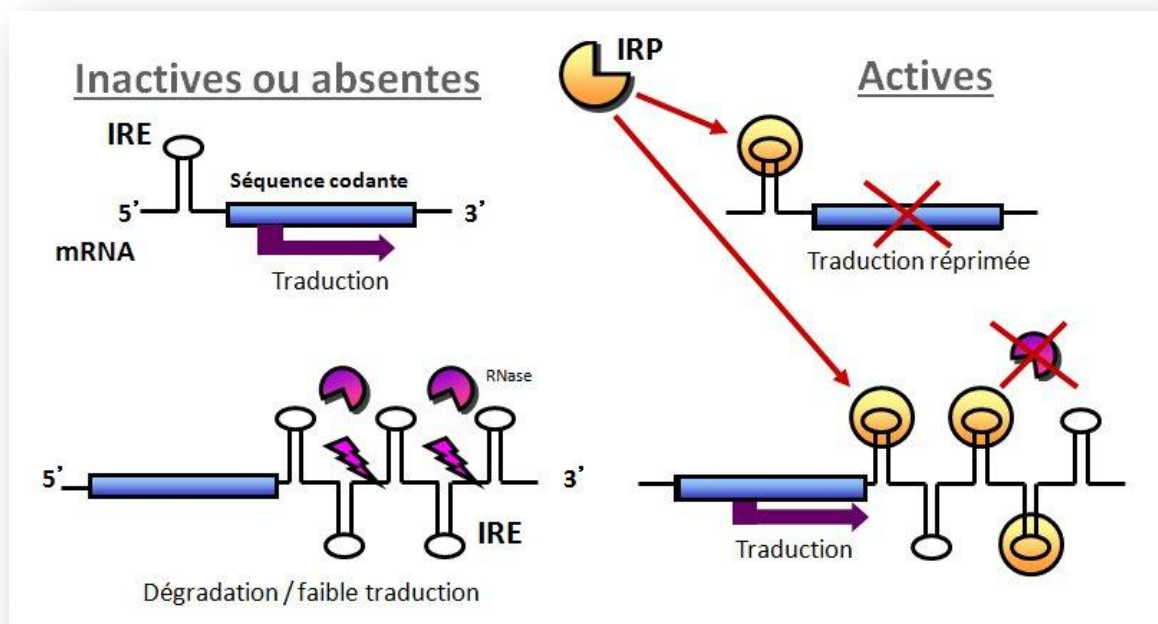


Figure 10. Fonctionnement du système Iron Responsive Element - Iron Regulatory Protein.

L'activation du système IRE-IRP, lors par exemple d'une carence en fer (*Fig. 11*), a donc un impact sur la régulation intracellulaire du fer, d'une part par la diminution de la traduction des sous-unité de ferritine et donc la limitation du stockage, et pour certains types cellulaires par la diminution de la traduction de la ferroportine préservant le fer au niveau intracellulaire. D'autre part dans certaines cellules l'augmentation induite des messagers du transporteur DMT1 et du récepteur de la transferrine favorise l'absorption et la pénétration du fer dans ces cellules. L'activation de ce système a également des répercussions dans d'autres voies de régulation, ainsi par exemple en cas de diminution de la concentration en fer, l'activation des régulateurs IRP réprime la traduction du facteur de transcription HIF 2 α , modulant ainsi le niveau d'érythropoïétine responsable du contrôle du taux de globules rouges (*Fig. 8*).

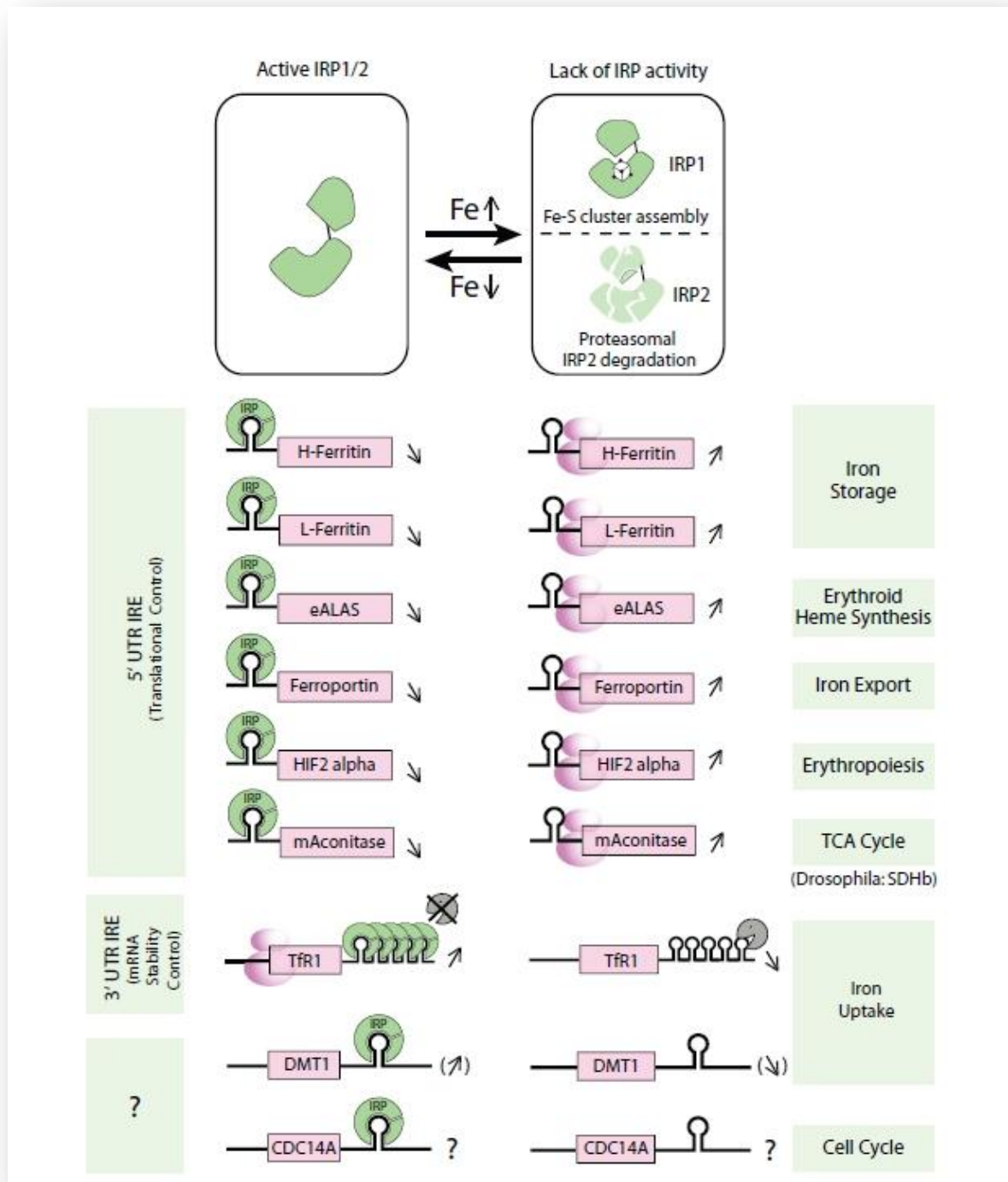


Figure 11. Conséquence de l'activation/inactivation des IRP sur la traduction des transcrits cibles.

(Muckenthaler et al., 2008)

2.2.2 Autres stimuli du système IRE-IRP

L'activité IRP est régulée par le niveau de fer, mais de nombreux autres agents ou conditions peuvent affecter cette activité en se superposant à l'effet de la concentration de fer.

- L'hypoxie: La diminution de la pression partielle en oxygène a pour conséquence d'inhiber la liaison de l'IRP à l'IRE, notamment pour IRP 1, mais accroît l'activité de IRP2. Ainsi sous hypoxie, la liaison d'IRP 1 à HIF 2 α est réduite, mais celle d'IRP2 sur ses cibles est accrue. (*Hanson et al., 1999; Meyron-Holtz et al., 2004b; Schneider and Leibold, 2003*).
- Le stress oxydant: Par la génération d'espèces réactives de l'oxygène, dont le fer participe à la production, le stress oxydant tend à réduire l'activité des IRP et ainsi réduit le niveau intracellulaire en fer (*Recalcati et al., 2010*). Mais un effet biphasique (augmentation puis réduction) de l'activité d'IRP 1 sous l'effet de peroxyde d'hydrogène a également été caractérisé (*Pantopoulos and Hentze, 1995*). L'inactivation des IRP lors de l'augmentation de la production intracellulaire d'ERO souligne les connexions de ce système régulateur avec le niveau des espèces oxydantes.
- Les espèces réactives nitrés: Le monoxyde d'azote active IRP 1 par la conversion de la forme aconitase (*Soum et al., 2003*) et l'ion nitrosonium l'inactive. Leurs effets sur IRP2 sont controversés.
- Autre: Les variations d'autres agents de signalisation extra-cellulaire, comme des cytokines ou des hormones, influent aussi sur l'activité des IRP, par des mécanismes partiellement compris et souvent indirects.

2.2.3 Dysfonctionnement du système régulateur et pathologies associées

L'importance du système IRE-IRP a été confirmée, entre autres, par les expérimentations sur les modèles murins, pour lesquels le génotype double IRP knock out (IPR1^{-/-} IRP2^{-/-}) n'est pas viable. La mort des embryons au stade blastocyte démontre l'importance du système pour le développement. Les animaux pour lesquels un unique IRP (IPR1^{-/-} ou IRP2^{-/-}) est manquant sont viables, suggérant la capacité

Introduction

d'un IRP à remplacer au moins partiellement l'autre (*Galy et al., 2005; Wang et al., 2007*). Ces travaux ont montré qu'un déficit unique en IRP2 (IRP2^{-/-}) était à l'origine d'une légère microcytose, d'une dérégulation de l'hématopoïèse et des troubles de la distribution du fer conduisant à une surcharge en fer pouvant aboutir à une neurodégénérescence, au moins dans l'un des contextes génétiques utilisés (*Cooperman et al., 2005; Galy et al., 2005*).

La pathologie humaine la plus emblématique du dysfonctionnement du système IRE/IRP est l'hyperferritinémie, marqué par une ferritine élevée avec un taux de fer sérique normal ou bas. Dans cette pathologie plusieurs mutations peuvent être identifiées sur l'IRE de l'ARNm de la sous unité L de la ferritine, au niveau de la boucle reconnue par les IRPs (*Aguilar-Martinez et al., 2005*). Ces mutations conduisent à une surproduction de la sous unité L par l'absence d'un blocage de la traduction (*Cazzola et al., 1997*). Cette pathologie se caractérise par une cataracte, sans aucune incidence au niveau hématologique.

Il a été identifié également chez un patient présentant une pathologie liée à la ferroportine et caractérisé par une surcharge en fer, une mutation en 5' des régions non traduites de l'ARNm de la FPN. Cette mutation induit une perturbation de l'expression de FPN (*Liu et al., 2005b*).

L'implication d'un déficit d'IRP2 dans des cas de protoporphyrinémie est suspectée en raison du phénotype observé chez les souris IRP2^{-/-} (*Cooperman et al., 2005*). On suspecte également d'autres anomalies du système IRE/IRP dans des pathologies moins spécifiques du métabolisme du fer, comme les maladies pulmonaires chroniques (exemple: BPCO) ou la maladie d'Alzheimer (*Rogers et al., 2002*).

Le système IRP-IRE est actif dans les cellules hématopoïétiques où son importance peut varier suivant la lignée et l'état de maturation des cellules. La caractérisation de l'état de ce système au cours de la maturation de chaque lignée est très incomplète. Mais le système IRE-IRP intervient aussi dans les autres cellules, en particulier celles qui prolifèrent, comme les blastes des LAM, qui doublent leur besoins en fer lors de chaque division. Enfin, deux observations d'intérêt en cancérogenèse ont montré qu'IRP2, en particulier un domaine spécifique de cette protéine (*Dycke et al., 2008*),

provoquait un accroissement de tumeurs implantées chez des souris immunodéprimées alors qu'IRP1 inhibait la croissance tumorale (*Chen et al., 2007; Maffettone et al., 2010*). L'importance de ces résultats pour les cellules hématopoïétiques normales ou malignes est inconnue, mais il apparaît extrêmement intéressant d'en examiner la portée dans les leucémies.

2.3 Les chélateurs du fer en thérapeutique

En raison de la toxicité cardiaque et hépatique de la surcharge en fer, l'utilisation des chélateurs est une alternative aux saignées. Indiqués dans les surcharges primaires de l'hémochromatose, ainsi que dans les surcharges secondaires à la transfusion sanguine comme c'est le cas dans les syndromes myélodysplasiques ou des hémoglobinopathies héréditaires (syndromes thalassémiques majeurs, drépanocytose). La chélation est privilégiée pour les patients dont la soustraction sanguine est difficilement réalisable, notamment les patients anémiques pour lesquels les transfusions de culot globulaire sont fréquentes et apportent l'équivalent de 200mg de fer intraveineux par culot transfusé. Trois chélateurs capables de lier principalement les cations trivalents par une liaison bidente ou tridente possèdent actuellement une autorisation de mise sur le marché en France (*Table VI*).

Table VI. Caractéristiques thérapeutiques des chélateurs utilisés en médecine humaine

	Déféroxamine	Défériprone	Déférasirox
Administration	Sous-cutanée perfusion continue	Orale 3 prises/j	Orale 1 prise/j
Dose	20-60 mg/kg/j	75-100 mg/kg/j	20-40mg/kg/j
Demi-vie plasmatique	Courte: < 20 minutes	Moyenne: <2h	Prolongée: 8-16h
Effets secondaires importants	Ototoxicité, toxicité oculaire, réaction cutanée locale	Troubles digestifs, neutropénie, agranulocytose	Troubles digestifs, augmentation de la créatinine
Passage intracellulaire	NON	OUI	OUI
Efficacité de chélation au niveau cardiaque	++	+++	+

Introduction

Le déféroxamine (ou desferrioxamine, Desféral[®]), produit d'origine bactérienne (produit par *Streptomyces pilosus*), est le chélateur de référence apparu dans les années 70. Bien que considéré comme le plus puissant des trois chélateurs utilisés actuellement en clinique, son administration en perfusion sous-cutanée à des doses journalières comprises entre 20 et 60mg/kg durant une période de 8 à 12h en raison de sa courte demi-vie (20 minutes) rend son utilisation contraignante. Le ratio de chélation est d'un atome de fer pour une molécule de chélateur (*fig. 12A*). Éliminé par voie rénale et ne présentant pas de passage membranaire, son action chélatrice se manifeste au niveau plasmatique. Sa toxicité est principalement cutanée liée à la tolérance locale de la perfusion. Toutefois pour de fortes doses (>50 mg/kg/j) l'existence d'une toxicité auditive et rétinienne doit nécessiter une surveillance annuelle.

Le déféripone (Ferriprox[®]) fut le premier chélateur en fer disponible par voie orale durant la fin des années 90. Avec une demi-vie d'environ 2h, l'administration de 75 à 100 mg/kg se fait en trois prises journalières. Le ratio de chélation est d'un atome de fer pour trois molécules de déféripone (*fig.12B*). Éliminé par voie urinaire, le déféripone a une capacité à pénétrer à l'intérieur des cellules et donc, à la différence du déféroxamine, la possibilité de chélater le fer intracellulaire. Ceci semble lui conférer un avantage sur l'élimination du fer au niveau cardiaque. Bien que l'AMM indique l'usage de ce chélateur uniquement pour les thalassémies majeures en seconde intention thérapeutique, son usage hors AMM est fréquent pour d'autres surcharges en fer. Il peut aussi être employé avec le déféroxamine dont l'association a démontré une efficacité thérapeutique supérieure dans la thalassémie (*Ruivard, 2013*). Sa toxicité est majoritairement digestive avec des troubles de type nausées, diarrhées, douleurs abdominales. Neutropénie et agranulocytose ont également été rapportées ce qui implique une surveillance biologique hebdomadaire.

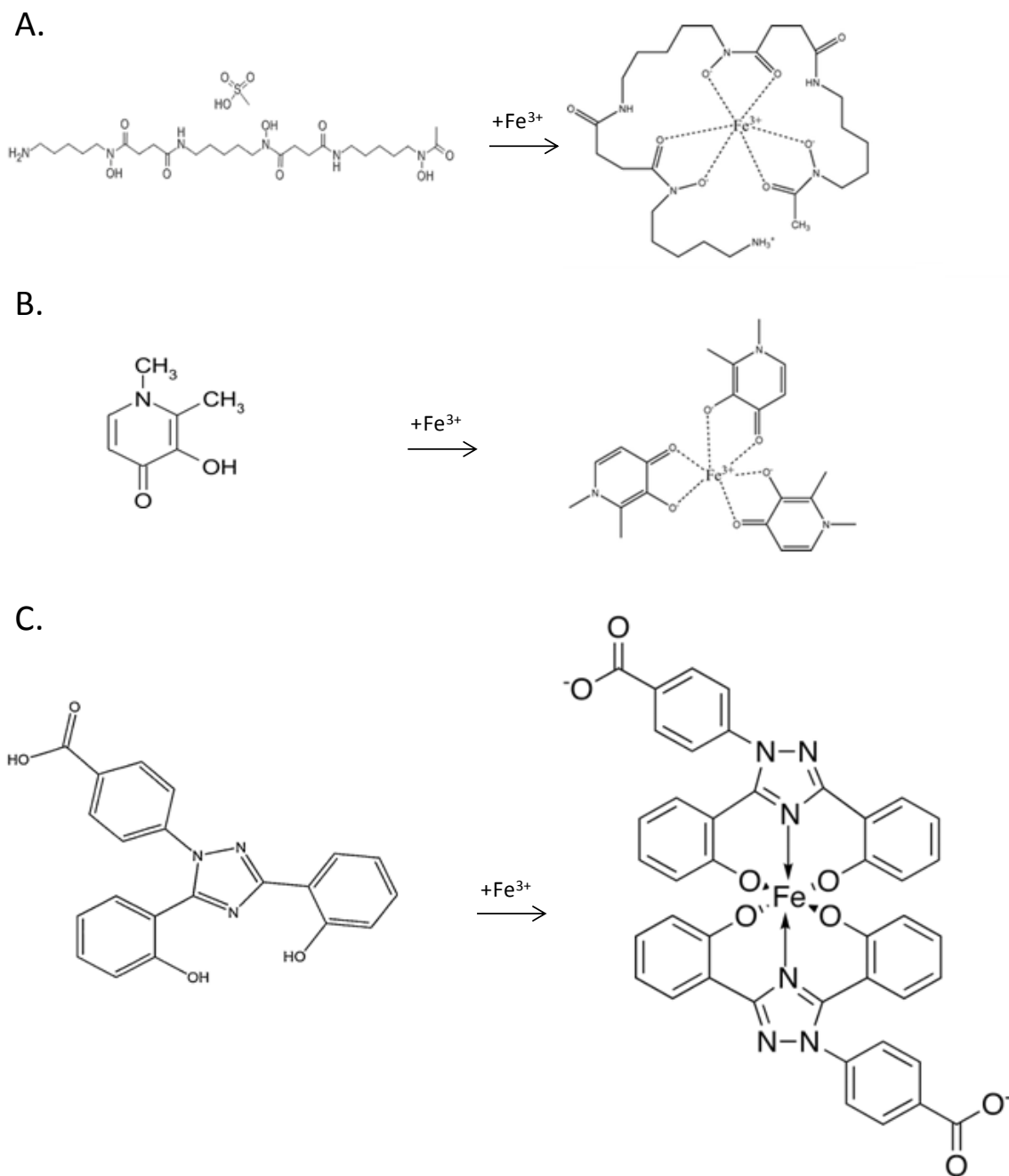


Figure 12. Structure chimique des chélateurs.

A. Déféroxamine, ratio 1:1; **B.** Défériprone, ratio 3:1; **C.** Déférasirox, ratio 2:1

Puis plus récemment (2005), fut commercialisé le déférasirox (Exjade®) un second chélateur par voie orale à l'indication plus large, à utiliser en seconde intention en cas de contre-indication ou d'usage inadapté du déféroxamine. Éliminé par voie biliaire, sa longue demi-vie (comprise entre 8 à 16h) permet une administration de 20 à 40mg/kg en une unique prise journalière. Tout comme le déféripone il existe un passage intracellulaire pour le déférasirox. Son ratio de chélation est d'un atome de fer pour deux molécules de déférasirox (*fig. 12C*). De plus, au-delà de son effet chélateur, deux études ont montré in vitro l'existence d'un effet inducteur de l'apoptose cellulaire passant par l'inhibition de NF-KappaB (*Messa et al., 2010*), et d'un effet antiprolifératif par l'inhibition de la voie de signalisation mTOR (*Ohyashiki et al., 2009*), d'où un très fort intérêt ces dernières années pour ce chélateur. Son efficacité au niveau cardiaque est moindre que ses deux prédécesseurs et quant à son efficacité au niveau hépatique elle est similaire à la déféroxamine. La tolérance digestive est cependant améliorée.

La mise en place d'une chélation et le choix du chélateur sont évalués au cas par cas. Aucune recommandation n'a été établie et l'usage hors AMM est fréquent. Comme le décrit la proposition d'algorithme de choix d'un chélateur de la (*fig.13*), le premier critère de choix repose sur la prise en compte de l'existence d'une surcharge hépatique en évaluant sur plusieurs mesures la ferritine sérique, reflet de la variation de la ferritine tissulaire. La chélation peut être envisagée au-delà d'une ferritine sérique à 1000-1500µg/l. L'efficacité d'un chélateur et son adaptation est à ce jour basé sur la mesure de ce paramètre biologique. L'IRM hépatique est également un examen complémentaire permettant d'approcher une quantification du fer hépatique avec un seuil indicatif de 80µmol/g au-delà duquel les complications hépatiques surviennent. En complément pour évaluer la surcharge cardiaque, une IRM cardiaque peut être réalisé en raison des modifications des paramètres de relaxation en cas de surcharge ($T2^* < 20\text{ms}$).

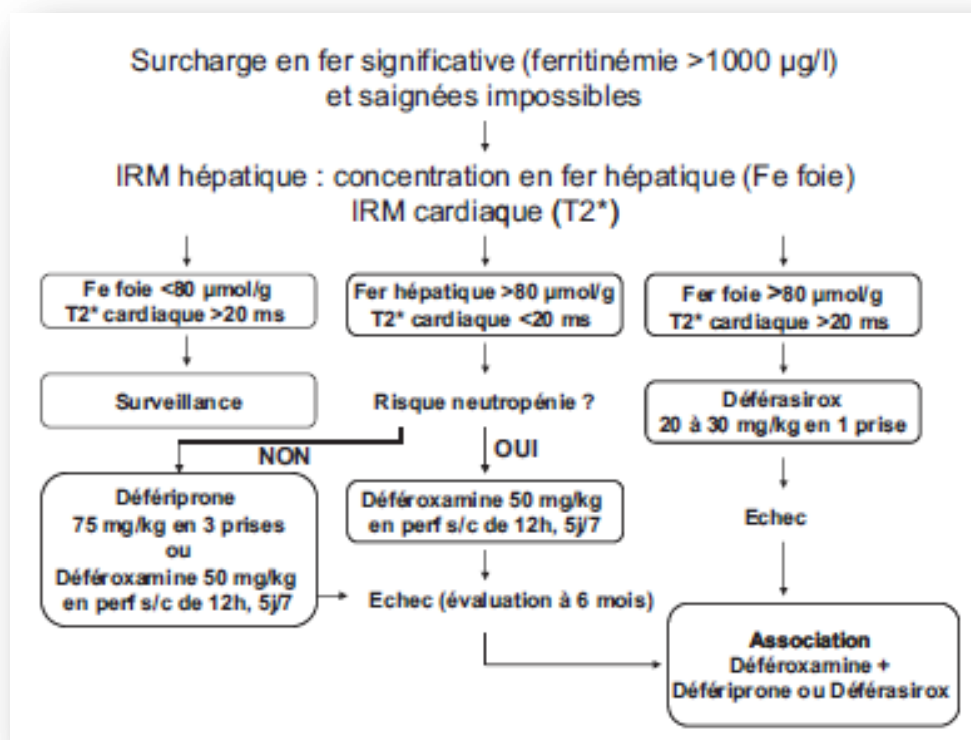


Figure 13. Choix d'un traitement par chélateur en fer.

(Ruivard et al. 2013)

3. RESEAU REGULATEUR DU FER ET RESEAU REDOX DANS L'HEMATOPOÏÈSE NORMALE ET LEUCEMIQUE

3.1 Le fer et son système régulateur IRE-IRP dans l'hématopoïèse normale

L'hématopoïèse qui correspond au processus de production de l'ensemble des cellules matures du sang à partir d'une quantité limitée de cellules souches hématopoïétiques médullaires comprend l'érythropoïèse, la granulopoïèse, la lymphopoïèse, la monopoïèse et la thrombopoïèse. Le fer et le système IRP interviennent dans l'érythropoïèse car son rôle est particulièrement critique pour la lignée érythroïde qui consomme la majorité des ressources en fer pour la production de l'hémoglobine des globules rouges.

Pour satisfaire leurs besoins en fer, les érythroblastes expriment fortement TfR1 à leur surface. Cette surexpression est retrouvée à chaque stade de différenciation (Sposi et al., 2000), à l'exception des phases ultimes quand la concentration cytoplasmique en

Introduction

hémoglobine atteint un plateau. Après internalisation du complexe Tf-TfR1, libération du fer, et import cellulaire via DMT1, la majorité du fer est utilisée par la mitochondrie pour la biosynthèse d'hème. Les modèles animaux déficients en Tf, TfR1 ou DMT1, aboutissent tous à des phénotypes avec dérégulation de l'érythropoïèse, marquée par des anémies sévères. Comme mentionné précédemment, les souris IRP2^{-/-} présentent une dérégulation de l'hématopoïèse et de la gestion cellulaire du fer (anémie microcytaire, protoporphyrie). Au niveau des cellules érythroïdes, ce manque en IRP2 ne semble pas être complètement compensé par IRP 1. Très récemment, il a été montré que les souris IRP1^{-/-} présentaient également une dérégulation de l'hématopoïèse mais associée à une hyperproduction de globules rouges (polyglobulie). Cela suggère l'existence d'un rôle d'IRP1 différent de celui d'IRP2 dans l'érythropoïèse. L'absence d'IRP 1 n'est pas compensé par IRP2 bien que selon l'âge de la souris une compensation par un facteur non identifié est observée (*Anderson et al., 2013*). L'enzyme 5-aminolevulinic acid synthase 2 qui participe à la biosynthèse de l'hème dans les cellules érythroïdes est régulée par le système IRE-IRP. Cette régulation limite la génération d'hème en cas de réduction des disponibilités en fer. Le fer s'il n'est pas utilisé peut également être stocké via la ferritine au sein des précurseurs érythroïdes. Les deux sous-unités de la ferritine sont également sous le contrôle du système IRE-IRP. Les modèles murins confirment cette implication du système de régulation avec ferritine et ALAS2 surexprimées chez les souris déficientes en IRP2.

FPN1 a également été observé dans tous les stades de l'érythropoïèse, conférant ainsi aux progéniteurs érythroïdes la capacité d'exporter le fer. De plus, l'expression variable des transcrits FPN1 durant la différenciation érythroïde témoigne d'une régulation importante du gène FPN1 dans les érythrocytes (*Cianetti et al., 2005*).

Si l'intervention du système IRE-IRP dans l'érythropoïèse ne fait aucun doute, une étude sur des cellules primaires murines suggère une intervention non monotone de ce système durant le processus de différenciation érythropoïétique (*Schranzhofer et al., 2006*). En effet, ce système serait évincé lors des étapes terminales de la différenciation des progéniteurs correspondant à la phase de très forte demande en fer,

avec notamment une expression des ARNm portant des IRE qui échappent au contrôle des IRP dans un processus qui n'est plus dépendant du flux de fer dans les cellules.

Concernant le système fer dans le processus hématopoïétique des autres lignées cellulaires, très peu d'informations sont disponibles. On peut cependant évoquer le travail de *Sposi et al.* à partir de progéniteurs hématopoïétiques dont la différenciation a été induite in vitro et qui révèle que l'expression d'IRP2 est maintenue à toutes les étapes de la différenciation érythrocytaire, monocyttaire, granulocytaire et mégacaryocytaire, alors que celle d'IRP1 ne l'est qu'aux étapes de la différenciation érythrocytaire (*Sposi et al., 2000*). L'expression et l'activité des deux IRP sont cependant augmentées lors de la transformation des monocytes en macrophages (*Recalcati et al., 2006*).

3.2 Contrôle redox de l'hématopoïèse normale

Il existe un lien direct entre hématopoïèse, oxygénation et réseaux régulateurs sensibles aux conditions d'oxydoréduction. Cela peut être illustré notamment avec l'implication d'HIF 2 α , cible du système IRP-IRE et inducteur de la production d'EPO par le rein en réponse à l'hypoxie. En effet, en situation d'hypoxie la cellule adapte en partie le métabolisme de l'organisme et la gestion du fer par l'intermédiaire des facteurs de transcription de la famille des *hypoxia inducible factors* dont HIF 1 α et HIF 2 α . Lors d'une faible oxygénation, l'action des prolylhydroxylases, enzymes fer et oxygène dépendantes, est inhibée. Cela réduit la liaison de HIF 1/2 à la protéine de *von Hippel-Lindau* et de ce fait stoppe la dégradation des HIF par le protéasome. La stabilisation des HIF conduit à leur accumulation et translocation dans le noyau, où en se liant à la sous unité β , ils forment un complexe, HIF 1 ou HIF 2, capable de se lier aux *hypoxia responsive element* (HRE) et ainsi de réguler un grand nombre de gènes. Parmi ces gènes, le gène codant l'EPO figure comme une des cibles de HIF 2. En raison de la présence d'un IRE en 5' de l'ARNm, HIF 2 subit une seconde régulation post-transcriptionnelle, fer dépendante, par le système IRE-IRP (*Sanchez et al., 2007*). Ce système permet la régulation de l'EPO afin d'ajuster le nombre de globules rouges à la disponibilité en fer et ainsi d'obtenir des érythrocytes normochrome et normocytaire.

Ce que confirment les modèles murins $IRP2^{-/-}$ par la présence d'une microcytose, bien qu'il soit aussi suggéré que le contrôle d'HIF 2 est une fonction majeure d'IRP 1 (*Anderson et al., 2013; Ghosh et al., 2013; Wilkinson and Pantopoulos, 2013*). Le gène codant TfR1 est aussi régulé par HIF en raison de la présence d'un motif HRE dans sa région promotrice.

D'autre part, les cellules souches hématopoïétiques prolifèrent dans la partie la plus hypoxique de la moelle (*fig. 14*) (*Eliasson and Jonsson, 2010; Jang and Sharkis, 2007*). Cette hypoxie est considérée par rapport à la normoxie de l'air ambiant, mais reste inférieure au seuil hypoxique déclenchant une réponse moléculaire (*Harrison et al., 2002*). La différenciation suit grossièrement le gradient d'oxygène (de 1 à 6%) présent dans la niche hématopoïétique au niveau médullaire (*fig. 14*). Le potentiel redox, qui traduit l'équilibre entre espèces oxydantes et anti-oxydantes (réductrices) et agit comme effecteur spécifique de certains modules régulateurs, impacte donc directement la balance entre auto-renouvellement, différenciation et prolifération des CSH et contrôle ainsi le destin cellulaire.

L'oxygène participe majoritairement à la production d'énergie au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale dont la réaction de réduction, couplée à la génération de potentiel transmembranaire entraîne la synthèse d'ATP. De nombreuses autres réactions catalysées par des dioxygénases requièrent de l'oxygène comme substrat. Les espèces réactives de l'oxygène étant les formes intermédiaires produites lors de ces réactions.

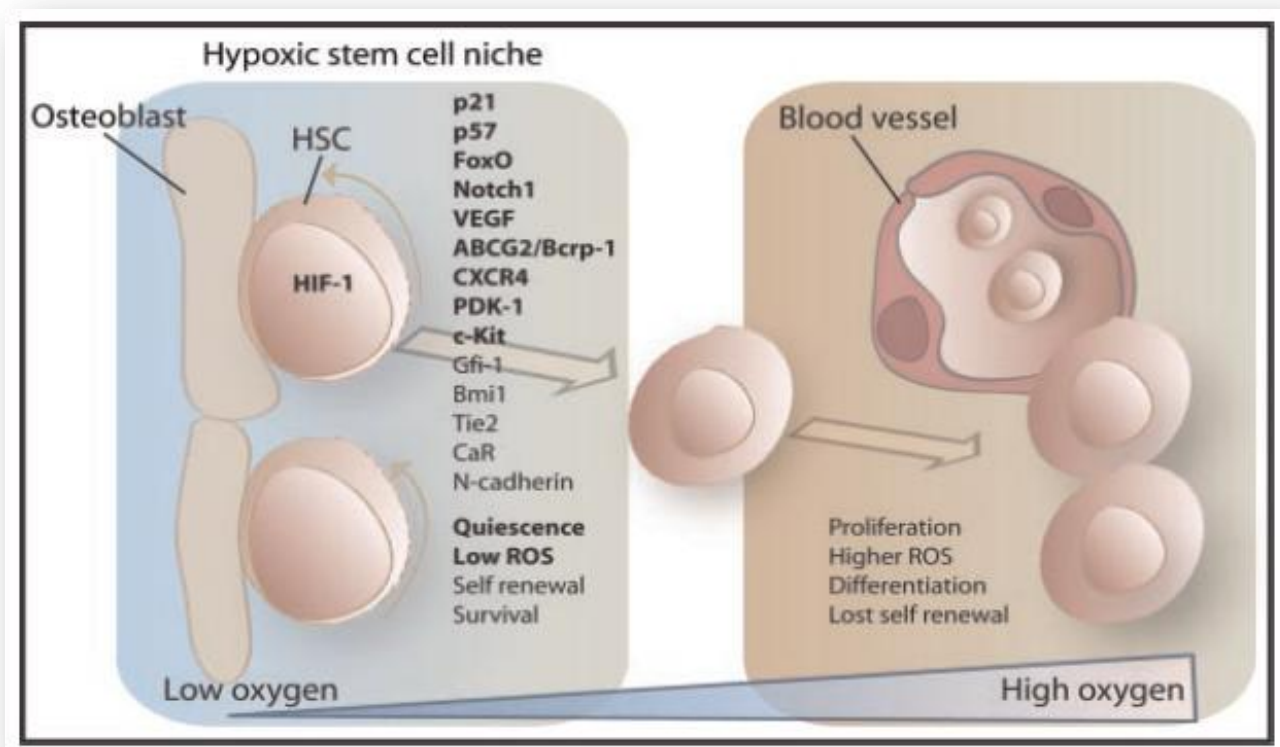


Figure 14. Les HSC dans la niche hématopoïétiques et les caractéristiques liées aux conditions hypoxiques. (Eliasson and Jonsson, 2010)

Si l'équilibre redox est déplacé au bénéfice d'espèces oxydantes, telles que les ERO, cela aboutit à un stress oxydant provoquant des dommages irréversibles aux composants cellulaires. Pour contre-balancer ce déséquilibre il existe des systèmes réducteurs faisant intervenir le glutathion, les thioredoxines, les glutaredoxines, les vitamines, et d'autres molécules ou activités anti-oxydantes. Avant même d'atteindre un niveau d'oxydation favorisant les dommages cellulaires, de faibles variations du potentiel redox peuvent modifier le comportement cellulaire en déclenchant une réponse anti-oxydante, et ainsi changer le destin cellulaire via l'activation de facteurs de transcription et de cascades de signalisation. En effet, des facteurs de transcription comme FoxO3, GATA-1, NFE2 sont redox-sensibles. Le niveau d'ERO régule l'activation de ces facteurs de transcription et joue un rôle déterminant dans l'engagement ou le déroulement des processus de maturation. En conséquence, la modulation des quantités d'ERO participe significativement à la régulation de l'hématopoïèse normale.

3.3 Relation entre l'équilibre redox, l'homéostasie du fer et leucémogénèse

Le fer est un élément indispensable à la croissance cellulaire. Les cellules cancéreuses requièrent donc des quantités de fer supérieures à d'autres cellules de même type car elles prolifèrent plus rapidement. Parmi leurs caractéristiques figurent une augmentation de la production de TfR1, favorisant un flux d'entrée de fer supérieur à celui de cellules normales, et un haut niveau d'expression de la ribonucléotide réductase (RR) qui témoigne d'un engagement (en phase S) dans le cycle cellulaire. Ces caractéristiques devraient en théorie les rendre plus sensibles à l'action des chélateurs du fer que des cellules non malignes, d'où le développement d'essais cliniques utilisant des chélateurs comme stratégie anticancéreuse.

De fait, il a été montré que la déplétion en fer arrête la croissance cellulaire et conduit à la mort cellulaire par apoptose (*Yu et al., 2007*). Cet effet se traduit par un arrêt du cycle, le plus souvent au niveau de la transition G1-S. Les mécanismes impliqués sont d'une part l'arrêt de l'activité de la ribonucléotide réductase, une enzyme nécessaire à la duplication de l'ADN et utilisant du fer (Fig. 10). A noter que cette réaction enzymatique nécessite un apport d'électrons via la thiorédoxine ou glutarédoxine et ainsi correspond à un point de convergence de la gestion cellulaire du fer et de la régulation redox. D'autre part, la privation de fer influe sur l'expression des cyclines A, E et D du cycle cellulaire par l'intermédiaire de variations des kinases CDK2 et CDK4, et des inhibiteurs de CDK tels que p16PINK4P, p21PWAF1/CIP1 ou p27PKIP1P (*Nurtjahja-Tjendraputra et al., 2007*) (Fig. 15).

L'ensemble de ces effecteurs du cycle est en relation avec d'autres régulateurs majeurs du cycle cellulaire tel que p53 et pRb (Fig. 15). Il est établi que le mécanisme utilisant la voie de p53 à l'origine de l'arrêt du cycle cellulaire fait appel, à côté de son effet transcriptionnel bien documenté, à des processus mal identifiés qui réduisent la disponibilité en fer intracellulaire (*Zhang et al., 2008*).

Introduction

De plus, il existe une régulation potentielle de CDC14A par les IRP via son IRE en 3'. Lors d'une déplétion, il y a augmentation de l'ARNm de CDC14A, lequel déphosphoryle p27^{kip1} et la cycline E nécessaire au passage en phase S (Sanchez et al., 2006).

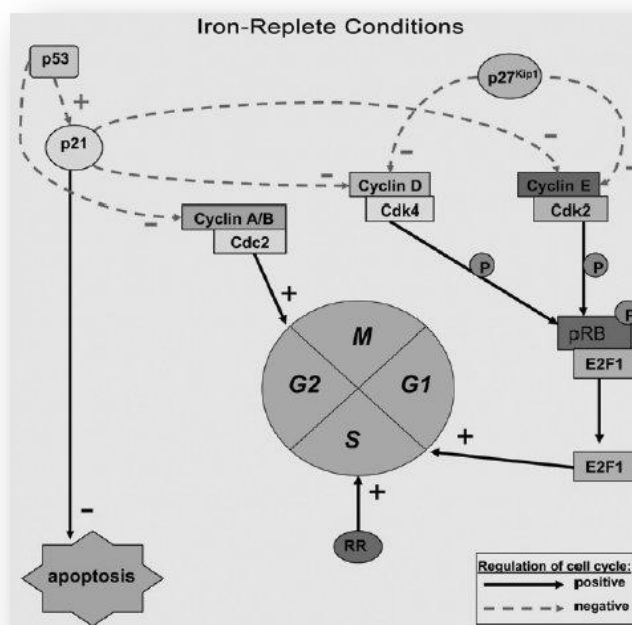


Figure 15. Système d'activation et de régulation du cycle cellulaire lors de condition de disponibilité en fer suffisante. Cdk: cyclin dependent kinase; pRb: retinoblastoma susceptibility gene product ; RR: ribonucléotide réductase; P: phosphorylation. (Yu et al., 2007)

Le rôle de l'homéostasie du fer sur l'équilibre mort cellulaire/prolifération est également modulé par des voies distinctes de celles impliquées dans le déroulement du cycle cellulaire. Ainsi, il a été observé une surexpression du gène REDD1 dans la lignée cellulaire K562 traitée par déférasirox. Cette surexpression conduit à une inhibition de la voie mTOR et donc de la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 aboutissant à une réduction de la prolifération cellulaire (Ohyashiki et al., 2009). Il a été également montré que le niveau de N-myc down regulated gene 1 (NDRG1), gène associé à des tumeurs moins agressives lors d'une surexpression dans certains cancers, est diminué chez les patients atteints de LAM par rapport à des donneurs sains. En

présence de chélateur, NDRG1 est dérégulé. Cet événement est associé à une reprise de la différenciation, mais également à un arrêt du cycle cellulaire en modulant notamment p21^{WAF1/CIP1} (Tschan *et al.*, 2010).

La dérégulation de la gestion cellulaire du fer est également une cause majeure de stress cellulaire par la capacité de certaines formes chimiques du métal à générer et convertir des espèces réactives de l'oxygène. En conséquence, les dérégulations de la gestion du fer par les cellules ont un lien direct avec la dérégulation des quantités d'ERO et donc des modules régulateurs qui y sont sensibles (Pourcelot *et al.*, 2013).

Les changements de l'équilibre redox participent à la leucémogénèse en déclenchant l'activation de ces modules régulateurs (Hole *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2004). Ainsi il a été montré que FLT3-ITD et Ras, sont sensibles à l'augmentation du potentiel redox. Les duplications internes de Flt3 induisent une augmentation de la production NOX-dépendante des ERO, associée à une augmentation des cassures de l'ADN qui pourraient expliquer le caractère péjoratif de ces mutations (Sallmyr *et al.*, 2008). Parmi les autres possibilités, l'inactivation de la phosphatase PTEN par H₂O₂ pourrait favoriser l'activation de la voie AKT dans les LAM. La présence de la protéine de fusion RUNX-ETO, associée à t(8,21), entraîne également une augmentation ERO-dépendante de la survie et de la prolifération des précurseurs hématopoïétiques. Dans la leucémogénèse, ceci peut être favorisé par une perturbation de l'activité anti-oxydante, notamment celle des facteurs de transcription FoxO impliqués dans la réponse anti-oxydante, la réparation de l'ADN et le destin cellulaire. La perturbation de FoxO est en lien avec l'activation de la voie AKT qui joue le rôle d'inhibiteur. De plus, dans les LAM, les blastes se distinguent par leur incapacité à se différencier, même en présence d'un niveau élevé d'oxygène. Ainsi le développement blastique apparaît comme une déficience de détection, de réponse et/ou d'intégration des signaux induits par la pression partielle en oxygène et le niveau du potentiel redox.

Objectif du travail de thèse

Comme nous venons de le voir, il apparait depuis quelques temps un lien, encore loin d'être parfaitement compris, entre la régulation de l'utilisation cellulaire du fer, l'équilibre d'oxydoréduction et la balance prolifération/différenciation des cellules leucémiques. Les nombreux intervenants cellulaires et voies de signalisation, les différents mécanismes de régulation et les nombreuses perturbations physiologiques ou pathologiques décrits précédemment soulignent la complexité de ces différents systèmes par leur imbrication. Ils forment ainsi des réseaux moléculaires interconnectés dont les modifications, suite aux mutations observées dans la LAM par exemple, induisent des changements phénotypiques très difficiles à prévoir, ce qui limite la conception d'actions thérapeutiques ciblées.

Dans ce travail nous nous sommes focalisés sur l'homéostasie du fer essentielle à toutes cellules de l'organisme par le rôle central que joue ce métal dans l'ensemble des activités intracellulaires. Le cœur de régulation de l'homéostasie du fer au niveau cellulaire que constitue le système IRE-IRP est donc d'un intérêt majeur.

Notre premier objectif fut de le caractériser qualitativement et quantitativement à plusieurs niveaux d'analyse au sein de modèles cellulaires leucémiques et de le comparer à la caractérisation de celui de progéniteurs témoins non pathologiques. Le comportement de ces diverses cellules a été étudié avant et après une perturbation pathologique simple que constitue la carence en fer. A travers cette caractérisation l'efficacité et la spécificité de ce système ont été étudiées par la mesure *in cellulo* de l'activité des protéines régulatrices sur les multiples cibles à réguler afin de déterminer s'il existe ou non une régulation post-transcriptionnelle préférentielle et hiérarchisée particulière aux cellules leucémiques. Le seuil de fer qui module ce système de régulation est essentiel. Il dépend d'une concentration en fer jusqu'alors indéterminée et dont l'impact est majeur sur le devenir cellulaire par le conditionnement de la balance prolifération-quiescence/mort cellulaire.

Objectifs

Le second objectif fut donc d'estimer ce seuil. Ainsi la quantité de fer requise par la cellule hématopoïétique progénitrice saine et la cellule leucémique pour survivre et se diviser a été estimée. Dans cette optique, nous avons conçu une expérimentation pour déterminer ces paramètres en minimisant l'introduction d'éléments extérieurs pouvant induire des biais, et en nous focalisant sur les données recueillies à partir du système endogène. Enfin, après avoir travaillé sur des modèles cellulaires de la pathologie leucémique, une première approche de ce système de régulation a été opérée rétrospectivement pour des progéniteurs leucémiques issus de patients porteurs de leucémie aigüe myéloïde afin d'identifier de futures pistes à explorer pour une étude clinico-biologique sur un échantillonnage plus large de patients.

L'un des intérêts d'un tel travail est de mieux définir les caractéristiques associées aux LAM qui permettent aux blastes de proliférer tout en diminuant leur tendance à se différencier. À plus long terme, l'étude de l'impact de modifications de ces réseaux étudiés devrait permettre de définir des stratégies thérapeutiques anti tumorales adaptées aux caractéristiques fonctionnelles des blastes sans affecter les cellules saines.

*Chapitre I : Caractérisation du réseau fer
organisé autour du système régulateur
central IRE-IRP dans les cellules
leucémiques en conditions de prolifération
et de déplétion en fer*

Caractérisation du réseau fer organisé autour du système régulateur central IRE-IRP dans les cellules leucémiques en conditions de prolifération et de déplétion en fer

1. CONTEXTE

1.1 L'action du système régulateur IRE-IRP est tissu dépendante au sein d'un organisme

Le système régulateur, dont la description fonctionnelle est décrite au paragraphe 2.2 de l'introduction, a été plus particulièrement caractérisé au sein des cellules intestinales pour comprendre principalement l'absorption du fer dans l'organisme, des cellules hépatiques pour comprendre principalement le stockage et le lien avec la régulation systémique, et sur des cellules hématopoïétiques comme les monocytes-macrophages. La majorité de ces caractérisations a été faite à partir de matériel murin. Cela a permis d'élucider le mécanisme d'action des IRP et d'identifier les différents intervenants. L'importance du système IRE-IRP dans le bon fonctionnement de l'organisme, ainsi que le champ d'intervention de chacun des éléments régulateurs, ont bénéficié de la génération de plusieurs modèles murins pour lesquels le phénotype a été étudié après extinction de la production de ces régulateurs (*Cooperman et al., 2005; Galy et al., 2005; LaVaute et al., 2001; Meyron-Holtz et al., 2004a*), mais aussi à partir de l'analyse de pathologies humaines. Comme IRP1 est modulé par interconversion d'activité (moonlighting protein) cette protéine est plus facilement détectée, parce que toujours présente, qu'IRP2 qui est efficacement dégradée (*Hentze et al., 2004; Meyron-Holtz et al., 2004a*). Dans plusieurs conditions physiologiques IRP1 est présent majoritairement sous forme aconitase, laissant IRP2 agir comme le principal régulateur. IRP2 peut être fortement exprimé dans certaines lignées et, comme le suggèrent *Recalcati et al.*, l'abondance de cette protéine peut dépendre de l'état prolifératif de la lignée en raison d'une réponse plus précoce que IRP1 pour gérer l'homéostasie intracellulaire du fer (*Recalcati et al., 1999*). IRP2 a un rôle important dans certains types cellulaires comme les lymphocytes (*Meyron-Holtz et al., 2004b*),

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

les monocytes ou macrophages (*Recalcati et al., 2006*) en situation normale ou pathologique. Mais son abondance varie lors de la transformation du monocyte au macrophage. Associé au résultat du phénotype murin $IRP2^{-/-}$ marqué par quelques traits plus évidents que ceux des modèles $IRP1^{-/-}$ (*Galy et al., 2005; Wang et al., 2007*), $IRP2$ a d'abord été considéré comme le régulateur majeur du métabolisme intracellulaire du fer chez l'homme. Une compensation partielle respective des $IRP1$ et 2 en l'absence de l'expression de l'un ou l'autre se produit (*Cooperman et al., 2005; Galy et al., 2005; LaVaute et al., 2001; Wang et al., 2007*), alors que des données plus récentes montrent des rôles physiologiques distincts pour $IRP1$ et $IRP2$, dont l'action spécifique d' $IRP1$ sur l'ARNm $HIF\ 2\alpha$ (*Anderson et al., 2013; Ghosh et al., 2013; Wilkinson and Pantopoulos, 2013*). Cependant comme démontré par *Meyron-Holtz et al.*, la tension partielle en oxygène au niveau tissulaire contribue à l'activité relative de chaque IRP dans l'homéostasie du fer (*Meyron-Holtz et al., 2004b*). L'activité $IRP2$ prédomine dans les cellules sous 3-6% O_2 correspondant à la situation physiologique dans la majorité des tissus de l'organisme humain, et au contraire pour des cellules soumises à 21% O_2 l'activité $IRP1$ prend le pas sur $IRP2$. Ainsi il est difficile de raisonner sur l'ensemble de l'organisme car il est évident que le système IRE-IRP dépend du tissu considéré, ce qui peut expliquer certaines observations apparemment contradictoires entre modèles murins et culture cellulaire in vitro.

Peu d'informations sont disponibles sur les cellules leucémiques, à l'exception de la lignée cellulaire K562 qui est relativement fréquemment utilisée comme modèle d'origine humaine. Mais les données récoltées sont généralement qualitatives et ne vont pas beaucoup plus loin que la démonstration de l'activation des IRP , $IRP1$ plus particulièrement, avec une répercussion sur les principales cibles IRE, et une activation sous la dépendance de la concentration en fer. Aussi, dans ce travail nous nous sommes efforcés d'obtenir le plus de données quantitatives possibles, et la caractérisation détaillée pour le modèle leucémique K562, ainsi qu'un modèle cellulaire leucémique moins différencié : la lignée KG1. Afin d'identifier la place exacte du système IRE-IRP dans la réponse cellulaire à la disponibilité en fer et dans

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

d'autres circonstances, les quantités relatives et absolues des éléments le composant restent à être élucider.

1.2 Spécificité d'action des régulateurs IRP 1 et 2 sur la traduction des ARN messagers cibles

Le motif palindromique IRE (*fig. I-1*), est composé de 25 à 30 nucléotides avec une tige en hélice double brin de 5 paires de base, et une boucle terminale dont la séquence est conservée (CAGUGH-3', avec H= A, C ou U). Ce motif se structure donc en épingle à cheveux. Le double brin est interrompu en son centre par un renflement qui peut être composé soit de 4 nucléotides (renflement en boucle) comme dans l'IRE de la ferritine, ou d'un unique nucléotide comme dans les autres IRE déterminés à ce jour. Cette différence de structure pour l'IRE ferritine est perçue comme une différence de sélectivité envers les deux IRP puisque sa modification induit des perturbations sélectives de la fixation des IRP (*Ke et al., 1998*). De plus, étant donné la variété des fonctions protéiques issues des différents ARN messagers porteurs de séquence IRE, il est supposé l'existence d'une régulation différentielle par les IRP de la traduction de ces différentes cibles.

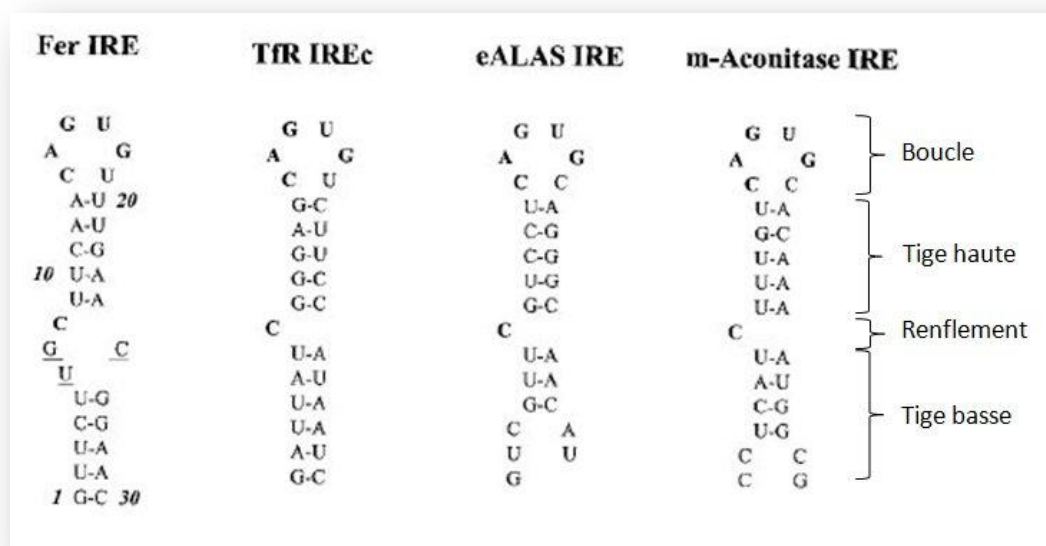


Figure I-1. Structure de quelques IRE.

(*Ke et al., 1998*)

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

Ainsi, d'une part sur la base de caractérisations structurales respectives des différents IRE et des IRP (*Butt et al., 1996; Henderson et al., 1996; Ke et al., 1998*), il est supposé que les différences structurales, notamment au niveau de la tige de l'IRE, impactent le nombre et la force des liaisons protéines-ARN ou créent des liaisons spécifique aux IRP. D'autre part, des preuves indirectes semblent conforter cette idée de sélectivité comme l'augmentation importante de la ferritine et de la ferroportine, avec une légère augmentation de l'aconitase mitochondriale lors de suppression de l'expression des IRP au niveau des cellules intestinales, en lien avec une différence d'intensité de répression. Ou encore, la différence de sensibilité au fer pour l'activation de la traduction de l'ARN messagers ferritine par rapport à celui de l'ALAS2 lors de la différenciation érythroïde (*Schranzhofer et al., 2006*). La principale analyse menée sur la caractérisation directe de l'interaction IRP-IRE par mesure des constantes de dissociation (**Table I-1**), le fût *in vitro* à partir d'IRP1 produit dans *Saccharomyces cerevisiae* et d'IRE synthétiques (*Goforth et al., 2010*). Cette étude conclut à l'existence d'une régulation hiérarchisée des liaisons aux IRE en raison de l'impact de la force de liaison entre le renflement (C8 ou la pseudo boucle trinuécléotidique) et IRP1. Des constantes de dissociation de l'ordre du picomolaire ont été établies dans cette même étude. Toutefois, ces expérimentations *in vitro* peuvent ne pas représenter ce qui se passe *in cellulo* en conditions physiologiques.

Table I-1. Constante de dissociation de IRP1 pour les IRE en 5'.
(*Goforth et al., 2010*)

IRE	K_d (pM) $\pm$ SEM	K_{rel}
L-Ferritin	14.0 $\pm$ 4.3 ^a	1.0 $\pm$ 0.3
H-Ferritin	22.1 $\pm$ 2.2 ^a	1.6 $\pm$ 0.2
Ferroportin	33.1 $\pm$ 9.0 ^{a,b}	2.4 $\pm$ 0.6
HIF 2 α	41.9 $\pm$ 10.4 ^{a,b}	3.0 $\pm$ 0.7
eALAS	87.8 $\pm$ 24.4 ^{b,c}	6.3 $\pm$ 1.7
m-Aconitase	129 $\pm$ 21.7 ^c	9.2 $\pm$ 1.6

Note: For K_d (pM) $\pm$ SEM, the values for each IRE are mean $\pm$ standard error of the mean for $n \geq 4$ determinations; values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). For L-ferritin versus HIF 2 α , $P = 0.067$; for ferroportin versus eALAS, $P = 0.078$.

2. ARTICLE EN PREPARATION

Characterization of the iron network organized around the IRE-IRP central node in proliferating and iron depleted leukemic cell lines

In preparation

Emmanuel Pourcelot^{a,b,d,f}, Marine Lénon^{a,b}, Fiona Louis^c, Peggy Charbonnier^c, Pascal Mossuz^{d,f}, Jean -Marc Moulis^{a,b,c}

^aUniversité Grenoble Alpes, Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics, and Environmental and Systems Biology, Grenoble, France

^bInserm, U1055, Grenoble, France

^cCommissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives – Institut de Recherches en Technologies et Sciences du Vivant, Grenoble – France

^dCHU Grenoble, Laboratoire d' Hématologie, Institut de Biologie et Pathologie, Grenoble – France;

^eCHU Grenoble, Clinique d'hématologie, Grenoble – France

^fUniversité Grenoble Alpes, TIMC – Imag CNRS 5525, Grenoble – France

keywords: IRE-IRP systems, leukemic cells, IRE mRNA quantification, IRP1 quantification

List of Abbreviations

Aconitase 2 (ACO2); 5-aminolevulinic acid synthase 2 (ALAS2); acute myeloid leukemia (AML); bovine serum albumin (BSA); deferoxamine (DFO); divalent metal transporter 1 (DMT1), erythropoietin receptor (EpoR); Ferritin (Ft); ferritin H or L subunit (FTH1/FTL); ferroportin 1a (FPN1a); firefly (FIR); $\alpha/\beta/\gamma$ -globin ($\alpha/\beta/\gamma$ GLO); hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (hPRT); hypoxia inducible factor 2 α (HIF2 α); hypoxia inducible lipid droplet-associated (HILPDA); inducible heme oxygenase (HO-1); iron regulatory proteins (IRP); iron responsive elements (IRE); renilla (REN); reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR); transferrin (Tf); transferrin receptor 1 (TfR1), untranslated regions (UTR).

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

2.1 Abstract

The specific translational control of proteins implicated in iron homeostasis is mediated by the IRE-IRP system in animals. At the cellular level, Iron Regulatory Proteins (IRPs) interact with untranslated regions of some messengers called Iron Responsive Elements (IRE) to modulate mRNA translation such as ferritin or transferrin receptor 1. Although this system was extensively studied over the last three decades, many points stay unclear such as the specificity of each IRP for their targets, the activation mechanisms of IRP1 to form the IRE binding , or cellular ratio of regulator/regulated sequences, *i.e.* IRP/IRE. Additional quantitative information is required to obtain a more integrated view of the IRP-IRE system at the cellular level and for advancement in the positioning of this system in different biological settings. In the context of pathological hematopoiesis, the cellular concentrations of most components (proteins and mRNA) of the IRP network and the ability of the endogenous IRP to regulate exogenous IRE have been measured in cell lines, models of leukemic progenitors. The obtained data reveal IRP regulation is almost exclusively mediated by IRP1, and these cells are characterized by a large excess of IRP1 over its presently identified targets. Interestingly, despite this excess, exogenous IRE are weakly regulated by IRP1, or not at all, which suggests the involvement of unclear factors that modulate the IRP activity. Altogether, these results highlight fundamental quantitative requirements of the regulator/regulated species ratio to enable translational regulation of specific mRNA, and they emphasize the importance of the structural context surrounding the regulated sequence for efficient modulation of translation.

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

2.2 Introduction

A significant scientific advance of the last decade has been the newly acquired technological ability to quantify, at the genome scale, the correspondence between messenger RNA abundance (*i.e.* gene expression) and corresponding protein amounts. In other words, transcription and translation rates, together with protein degradation rates, could be measured to provide a synthetic view of the concentrations of the major acting components of cellular biology (*Joyce and Palsson, 2006; Maier et al., 2011*). In the case of eukaryotic cells and their intricate pathways, such information is of premium importance to understand the numerous regulatory steps occurring along the way from genomic information to cellular functions.

From most studies in this domain (*Schwanhäusser et al., 2011; Vogel et al., 2010*), it appears that translational control plays a larger role than was previously suspected in the face of the diversity and efficiency of transcriptional regulation. The translation of messenger RNAs can be modulated by many mechanisms that have been separated between global control, where the translation efficiency of the transcriptome is modulated via the translational machinery, and specific control in which features of a given subset of mRNAs (*cis*-elements) is targeted by *trans*-regulatory agents (*Gebauer and Hentze, 2004*). Among the latter, messenger ribonucleoproteins and mi-RNA (micro-RNA) provide means to finely tune translation of targeted mRNAs.

One of the most representative and better known examples of specific translational control is afforded by the Iron Regulatory Proteins (the two IRPs) interacting with stem-loop structures in the UTR (untranslated regions) of some messengers in animals (*Wang and Pantopoulos, 2011*). These *cis*-elements are called Iron Responsive Elements (IRE). The regulated mRNAs encode proteins directly involved in iron handling at the cellular level, such as transferrin receptor 1 or ferritins. Other targets of IRPs are more remotely associated with

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

iron, as they participate in progress of the cell cycle or adjustment to variations of available oxygen (*Recalcati et al., 2010*). Over the last three decades a lot of qualitative information has been gathered on this system, at all relevant levels of analysis, from molecules (*Volz, 2008*) to model animals (*Muckenthaler et al., 2008*) and human pathologies (*Zhang et al., 2014*). However, some particular points, such as the specificity of the two IRPs for their different mRNA targets and the physiological importance of possible differences, is not perfectly clear. Also the link between the regulatory role of IRP1 and its alternative activity as cytosolic aconitase remains obscure, despite being a canonical example of a moonlighting protein bridging intermediate metabolism and post-transcriptional regulation (*Hentze and Preiss, 2010*).

Furthermore, the abundant literature on the translational system organized around the IRPs is seemingly devoid of quantitative data, with a handful of exceptions. This observation contrasts with the current efforts to weight the importance of the different levels of regulation as recalled above. A more integrated view of the IRP-IRE system at the cellular level and advancement in the positioning of this system in particular biological settings are thus needed. Toward this aim, the cellular concentrations of most of the proteins building the IRP network and the ability of the endogenous IRP to regulate exogenous IRE have been measured in models of hematopoietic progenitors. Beyond its intrinsic biochemical interest, such information in this biological context is relevant to further understand the role of iron homeostasis in normal and pathological hematopoiesis (*Pourcelot et al., 2013*). Indeed, iron chelation therapy has been shown to contribute to improvement of particular leukemic patients (*Paubelle et al., 2013*), and it is of interest to support these observations by further mechanistic insight.

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

2.3 Materials and methods

2.3.1 Cell lines

The cell lines used in the present study originated from the ATCC biological resource. The human myeloid leukemia KG1 and K562 cells were grown in RPMI-1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest, origin: South America, batch containing 1.7 mg of iron/L), 1% L-glutamine, 100 U of penicillin/ml and 0.1 mg streptomycin/ml at 37°C with 5% CO₂. Viable cells were determined by Trypan blue staining and quantified with a LunaTM counter (Logos).

2.3.2 Iron depletion

After routine maintenance, cell lines were handled in the fresh media (*Pourcelot et al., 2015*) and seeded at 5×10^5 cell/mL. The chelating agent was added for 24 hours. Deferoxamine mesylate salt (Sigma) was used at 200 μ M.

2.3.3 IRP activity measurement

Recombinant human Iron Regulatory Proteins 1 and 2 were obtained as previously detailed (*Brazzolotto et al., 1999; Dycke et al., 2007*). IRP1 and IRP2 RNA-binding activities were measured by electrophoretic mobility shift assays with 3 μ g of total protein extracts. The minimal sequence of human ferritin H-chain Iron Responsive Element (IRE) was biotin-labeled with biotinylated cytidine (bis)phosphate using T4 RNA ligase (Thermo Scientific). The IRE-IRP reaction was carried out as previously described (*Brazzolotto et al., 1999; Dycke et al., 2007*) and the complexes were separated on non-denaturing 4% PAGE in 0.5X TBE, transferred onto HybondTM N+ membrane (GE Healthcare) and the biotinylated bands were detected after interaction with the streptavidin-horseradish peroxidase conjugate by the chemiluminescent luminol product. To reveal the full amount of IRP1 activity (conversion of the aconitase form into the IRE binding one), 2% v:v of β -mercaptoethanol was added in the reaction. Quantification of the signals was done with the Image J software (v1.47, Wayne

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA).

2.3.4 Western blotting

Ten to forty µg of total proteins were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis on 8% or 15% gels, and proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes. The blots were saturated with 10% non-fat milk in PBS-Tween 0.2% and probed overnight at 4°C with antibodies against IRP1 (rabbit, 1:500) (*Martelli and Moulis, 2004*), IRP2 using as antigen the full specific IRP2 peptide (rabbit, 1:250) (*Dycke et al., 2007*), a fragment of it (rabbit, 1:2000) (Cécile Bouton, Gif-sur-Yvette, personal gift), or commercially available antibodies (mouse, 4G11-sc33680, Santa cruz, 1:1000; goat, EB09488, Everest Biotech, 1:250; rabbit, Alpha Diagnostic, 1:1000); ferritin (1:1000, Cell Signaling), transferrin receptor 1 (1:1000, Abcam), and actin (1:250, Sigma Aldrich). Following three washes with PBS-Tween 0.2%, the blots were incubated with peroxidase-coupled goat anti-rabbit IgG (Bethyl) at a dilution of 1:5000, or rabbit anti-goat IgG (Abcam, 1:2000), or goat anti-mouse IgG (Anaspec, 1:5000) for 1h at room temperature, followed by detection with the Pierce ECL western blotting substrate (Thermo Scientific). Recombinant human Iron Regulatory Proteins 1 (IRP 1r) and human placenta ferritin (Sigma) were used for quantification of IRP1 and Ft in total protein extracts. Quantification of the signals was done with the Image J software.

2.3.5 Cloning of regulatory IRE in pGL3-control

The IRE-bearing fragments listed in **table 1-2** were cloned in the pGL3-control plasmid (Promega) cleaved with *HindIII* and dephosphorylated with calf intestine alkaline phosphatase (MBI Fermentas) according to the manufacturer instructions. The restriction site lies downstream of the SV40 promoter and upstream of the *luc* coding sequence in this plasmid. The two oligonucleotides bearing the complementary IRE sequences of each studied mRNA were chemically synthesized (Eurofins mwg, Operon), and 2 nmol of each

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

strand were phosphorylated with 20 u. of T4 polynucleotide kinase (Euromedex, Souffelweyersheim, France) with 100 µM of ATP in 20 µl of reaction volume.

The phosphorylated duplex was inserted into the cleaved and dephosphorylated plasmid by ligation with T4 DNA ligase (MBI Fermentas) in a 1:5 plasmid/insert molecular ratio. Competent *E.coli* DH5α cells (Invitrogen) were then transformed by 50 fmol of the ligated plasmid, spread on Luria broth containing 75 µg/ml of ampicillin, and grown overnight at 37°C.

Table I-2. IRE used to build plasmids encoding IRP regulated activities.

IRE	^a	Sequence ^b
FTH1	5'	AGCTTGGGTTTCCTG <u>C</u> TTCAA <u>CAGTGCTTGGACGGAAACCCTCTAGA</u>
FTL	5'	AGCTTCTGTCTCTTG <u>CTTCAACAGTGTTTGGACGGAACAGATCTAGA</u>
ACO2	5'	AGCTTGGGTCAT <u>C</u> TTTGT <u>CAGTGCACAAAATGGCCCTCTAGA</u>
ALAS2	5'	AGCTTGGGGTT <u>C</u> GTCTC <u>CAGTGCAGGGCAACCCCTCTAGA</u>
FPN1a	5'	AGCTTTCCAACTT <u>C</u> AGCTA <u>CAGTGTTAGCTAAGTTTGGAAAGTCTAGA</u>
HIF2α	5'	AGCTTGGGTACAAT <u>C</u> CTCGG <u>CAGTGTCCTGAGACTGTACCCTCTAGA</u>
DMT1	3'	AGCTTGCCAT <u>C</u> AGAGCC <u>CAGTGTTTCTATGGTCTAGA</u>
TfRb	3'	AGCTTGGGATTAT <u>C</u> GGAAG <u>CAGTGCCTTCCATAATCCCTCTAGA</u>
CDC14A	3'	AGCTTGGGATATTTA <u>C</u> ATGTAC <u>CAGTGTTACATTATATATCCCTCTAGA</u>
AHSP	3'	AGCTTGGGCAATAA <u>A</u> GACCAG <u>TGCTGGTTTTGTTGCCCTCTAGA</u>

^a Position of the IRE relative to the coding sequence of the gene in the human genome

^b the predicted loop and unpaired base of the stem (bulge) are underlined

To select the plasmid constructions, colonies were picked and grown in terrific Broth liquid medium (Gibco) with 100µg/ml ampicillin. Plasmid DNA was purified (Plasmix kit, Talent Srl, Trieste, Italy), selected by restriction analysis for the presence of the insert, and eventually identified by sequencing.

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

2.3.6 Cell transfection and *in cellulo* measurement of IRE –IRP activity

KG1 and K562 cells were transfected with the firefly luc-encoding plasmid and a control of transfection (pGL4.75, Promega) at the same time using the Cell Line Nucleofector kit (Lonza) and the Nucleofector II system (Amaxa Biosystem, now owned by Lonza). After transfection, cells were grown for 24 hours at 37°C, 5% CO₂, in 2 ml of their usual culture medium. Cell viability was measured and cells were lysed for measurement of both firefly and Renilla luciferase activities with the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) on the Infinite M200 plate reader (Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland) according to the manufacturer instruction.

For data analysis, the ratio of Renilla luciferase activities between transfections using the IRE(-) on IRE(+) forms of the pGL3 plasmid was calculated and data from these transfections were considered only if this ratio was 1 ± 0.25 to guaranty similar transfection efficiencies. The firefly luciferase activity for both IRE orientations was normalized to the Renilla one, considering also the previously calculated ratio. Last the firefly luciferase activities were reported to the cell number or the protein concentration in the cell lysate.

2.3.7 Measurements of mRNA

Total RNA was purified from KG1 and K562 cells grown in the absence and in the presence of 200 μ M deferoxamine for 24 hours using NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel). Complementary DNA was synthesized from 1 μ g of RNA with modified Moloney Murine Leukemia virus reverse transcriptase (M-MuLV RT, Euromedex) and oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer, and diluted 30 fold. It was amplified by real time qPCR (C1000 Thermal Cyclor CFX96, BioRad), using validated primers (**table I-3**) and the HOT Pol Evagreen qPCR Mix Plus (Euromedex).

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

Table I-3. qPCR primer sequences

Table I-3: qPCR primer sequences						
Gene		Sequence			Bp	Efficiency
Homo sapiens ferritin heavy chain	FTH1	Forward:	CGAGGTGGCCGAATCTTCC	19-mer Tm=61		
		Reverse:	GTTTGTGCAGTTCCAGTAGTGA	22-mer Tm=58.4	133	99,2
Homo sapiens ferritin, light polypeptide	FTL	Forward:	CAGCCTGGTCAATTGTACCT	21-mer Tm=57.9		
		Reverse:	CCAGTTCGCGGAAGAAGTG	19-mer Tm=58.8	113	101,1
Homo sapiens solute carrier family 40 member 1 (SLC40A1)	FPN1	Forward:	CACAATACGAAGGATTGACCACT	23-mer Tm=58.9		
		Reverse:	ATCCCCGAAATAAAGCCACAGC	21-mer Tm=57.9	107	96
Homo sapiens aminolevulinate, delta-, synthase 2	ALAS2	Forward:	CTACCCAAGGACCAAACTGTTC	22-mer Tm=60.3		
		Reverse:	GACCAGGGAGCTAGGCAGAT	20-mer Tm=61.4	202	100,8
Homo sapiens aconitase 2, mitochondrial (ACO2)	ACO2	Forward:	CCACTGTGACCATCTGATTGAA	22-mer Tm=58.4		
		Reverse:	CACGCCATATTTGGCACCTG	20-mer Tm=59.4	117	81,7
Homo sapiens transferrin receptor (p90, CD71) (TFRC)	TfRC	Forward:	ACCATTGTCATATACCCGGTTCA	23-mer Tm=59		
		Reverse:	GGCCTTTGTGTTATTGTCAGCAT	23-mer Tm=59	115	96,5
Homo sapiens solute carrier family 11, member 2 (SLC11A2)	DMT1	Forward:	TCTACATTTGGGCAGTGGG	19-mer Tm=56.7		
		Reverse:	GATGGCAATAGAGCGAGTCAG	21-mer Tm=59.8	146	115
Homo sapiens aconitase 1, soluble (ACO1)	IRP1	Forward:	GATATGGGCGCTTACCATTTTCG	23-mer Tm=60.6		
		Reverse:	GGCACACCCGTAAGTCCTG	20-mer Tm=61.4	184	100,5
Homo sapiens iron-responsive element binding protein 2 (IREB2)	IRP2	Forward:	CAATCCATCTGTCATGCTTGC	21-mer Tm=58		
		Reverse:	GGTAATACTCCAATTGAAGTGAAGG	24-mer Tm=61	144	102
Homo sapiens hemeoxygenase (decycling) 1 (HMOX1)	HMOX1 (HO-1)	Forward:	CAGTGCCACCAAGTTCAAGC	20-mer Tm=59		
		Reverse:	GTTGAGCAGGAACGCAGTCTT	21-mer Tm=60	112	92,5
Homo sapiens heme oxygenase (decycling) 2 (HMOX2)	HMOX2 (HO-2)	Forward:	GGAGCGCAACAAGGACCAT	19-mer Tm=58.8		
		Reverse:	TCCTCCCAGTTTTACCAAAGA	22-mer Tm=58.4	114	92,5
Homo sapiens hypoxia inducible lipid droplet-associated	HILPDA	Forward:	AAGCATGTGTTGAACCTCTACC	22-mer Tm=58		
		Reverse:	TGTGTTGGCTAGTTGGCTTCT	21-mer Tm=58	144	98.4
Homo sapiens erythropoietin receptor (EPOR)	EpoR	Forward:	CAATGAAGTAGTGCTCCTAGACG	23-mer Tm=60.6		
		Reverse:	CACCTCGTAGCGGATGTGA	19-mer Tm=58.8	130	100,1
Homo sapiens hemoglobin, alpha 1 (HBA1)	αGlo	Forward:	CTCTTCTGGTCCCCACAGACT	21-mer Tm=62		
		Reverse:	GGCCTTGACGTTGGTCTTG	19-mer Tm=59	76	115
Homo sapiens hemoglobin, beta (HBB)	βGlo	Forward:	CTCATGGCAAGAAAGTGCTCG	21-mer Tm=59.8		
		Reverse:	AATTCTTTGCCAAAGTGATGGG	22-mer Tm=56.5	180	90
Homo sapiens hemoglobin, gamma A (HBG1)	γGlo	Forward:	GGTGCAGGCTTCCTGGCAGA	20-mer Tm=64		
		Reverse:	GCTCTGAATCATGGGCAGTGAGC	23-mer Tm=64	185	104

2.3.8 Absolute quantification of mRNA

The RT reaction used saturating amounts of enzyme (200 units) with ca. 1.5µg/ml mRNA contained in 1µg (50 µg/ml) of total RNA, and 25 µg/ml of oligo (dT)₁₂₋₁₈, as recommended by the manufacturer to optimize yields. It is thus postulated that cDNA synthesis used up all limiting reactant. In our calculations, complete elongation of all primer would generate 5 µM of product, and maximal copy of mRNA 12 µM: we have thus considered that this reaction

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

could not produce more than 5 μ M of cDNA. The initial mRNA in the added total RNA sample was estimated by considering that mRNA represents ca. 3% of total RNA which correspond to 100fmol of mRNA of average length 1000 nt. Thus, dividing the estimated maximal product of 1000 nt length by the initially added amount of mRNA substrate of the same size indicates that 1000 copies of cDNA were produced per copy of mRNA of 1000 nt. This average value was then corrected according to the size of the mRNA of interest being measured in the PCR experiment.

2.4 Results

2.4.1 Iron regulation of the Iron Regulatory Proteins in models of myeloid leukemic cells

It has long been established that iron deprivation enhances the IRP activity in metazoan cells (*Leibold and Munro, 1988; Müllner et al., 1989; Rouault et al., 1988*). It was previously shown that exposing growing K562 or KG1 cells to 200 μ M desferrioxamine (DFO) stopped growth and induced cell death (*Pourcelot et al., 2015*). The DFO treatment is expected to enhance the IRE-binding activity of IRP, but, likely, in different proportions depending on the cell model. In K562 cells, the enhancement of IRP activity was 2.1–fold (SD = 0.4, n=12 separate experiments), similar to KG1 cells, 2.2–fold (SD = 0.5, n=7). The activity contributed by IRP1 arises from a fraction of the total IRP1 protein and a strong reducing agent converts all of the protein present in the sample into the IRE binding form (*Brazzolotto et al., 1999; Hentze et al., 1989*). By adding 2% 2-mercaptoethanol (2ME) to the IRP-IRE binding assays, it was found that the total of (IRE-binding) active IRP1 was similar to that obtained upon treating cells with DFO for 24 h. Therefore, addition of a chelator such as DFO to the growth medium revealed all IRP activity present in cells, as addition of 2ME does in the cell lysates.

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

In all experiments aimed at enhancing IRP activity by iron scavenging, IRP2 should have been evidenced, as it has been in the past in other cell types (*Guo et al., 1995a; Samaniego et al., 1994*). However, K562 never displayed any evidence for the presence of IRP2 after sustained chelator treatment, and the lysates of similarly treated KG1 cells never showed an IRE-IRP2 complex that was more than 20% of that of the IRP1-IRE complex: the IRE-IRP2 complex was generally undetectable (**Fig. I-1**). To confirm this result, Western blots were run with up to 40 μ g of cell lysates, using either commercially available antibodies, or locally produced ones using the purified specific IRP2-domain (*Dycke et al., 2007; Ferecatu et al., 2014*) as antigen. We also failed to identify IRP2 in these experiments.

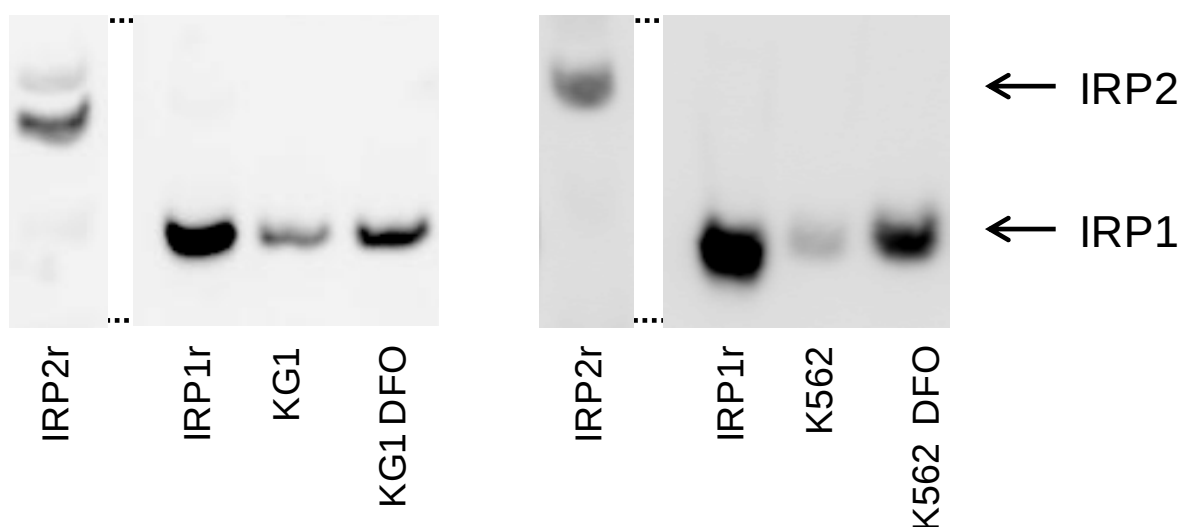


Figure I-1. IRP activity in KG1 and K562 cell lines before and after DFO treatment.

IRP activity was studied by RNA electrophoretic mobility shift assay of lysates from both cell lines with proliferating cells and after iron chelation with 200 μ M deferoxamine for 24 hours. The positions of the bands corresponding to recombinant IRP1 and IRP2 in this assay are indicated on the right side. This membrane is representative of the all experiments in which IRP2 activity was not detected.

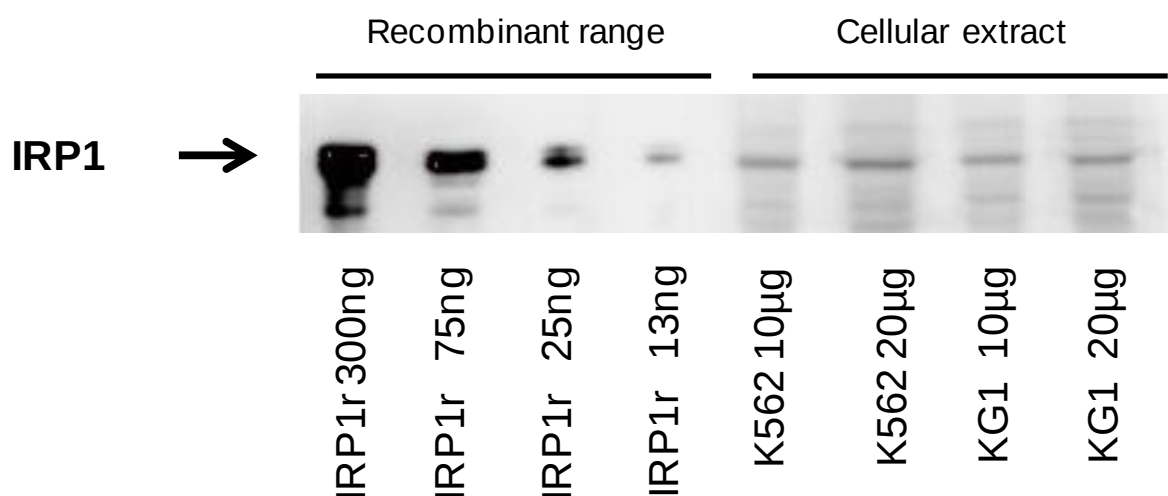


Figure I-2. IRP1 quantification

Representative Western blot used for IRP1 quantification using recombinant IRP1.

2.4.2 Quantitative analysis of Iron regulatory Proteins in models of myeloid leukemic cells

The organization of the network regulated by the IRP has to be described in quantitative terms. Toward this aim the endogenous amounts of these regulators was determined by quantitative Western blots, with the use of pure recombinant IRP1 (*Brazzolotto et al., 1999*) as a reference (**Fig. I-2**). In 6 separate experiments, the IRP1 concentration was determined in the [0.2 - 1.5] μM range for growing K562 cells. IRP2 was not taken into account as it seems not to be present and active in our experiments (see above). Hence this concentration range determined by WB is an upper limit of active IRP(1), which is reached only when all IRP1 is activated as after extensive iron chelation (see above). Similar estimates in KG1 cells gave a slightly shifted, but largely overlapping, range of [0.5 - 3.4] μM (**Fig. I-2**).

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

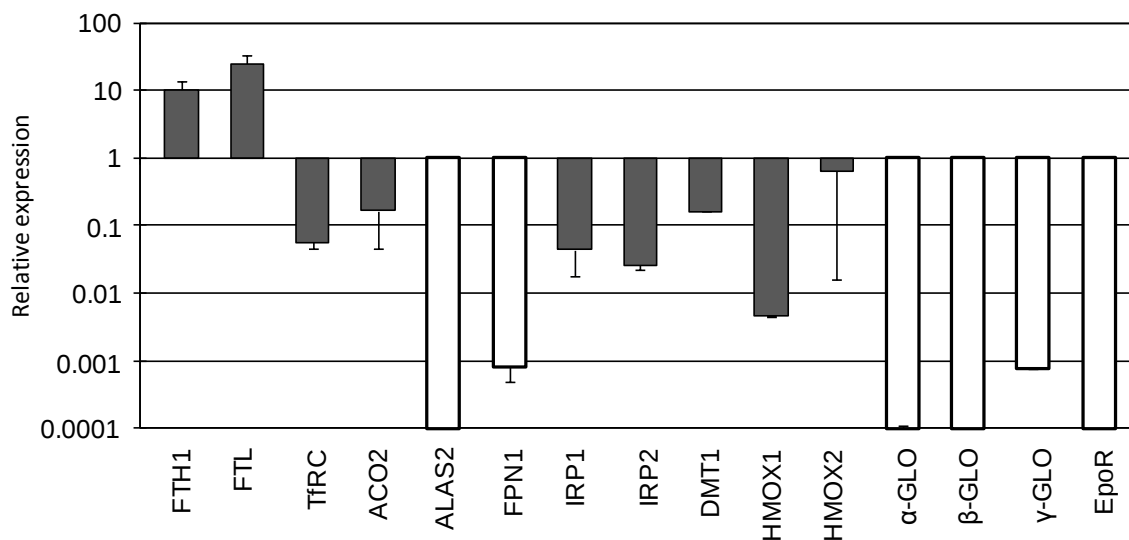
The same type of experiment was carried out for ferritin. The concentration of the 24-mer complex was determined in the [10 – 540 nM] range in growing K562 cells (8 measurements). These values decreased after 24 h of iron withdrawal with DFO, as expected. Determinations in KG1 cells fell in the same range.

2.4.3 The targets of IRP: transcriptional profiles

Since the Iron Regulatory Proteins bind to mRNAs, a large panel of the latter was measured by RT-qPCR in order to estimate the number and distribution of the endogenous targets of the regulatory proteins. This was done with RNA purified from growing cells of the two cell lines K562 and KG1. Measured levels of a series of mRNA were referred to the gene of hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (hPRT). The invariability of this gene was checked by running initial experiments with two other reference genes 36B4 and GAPDH. Taken as a whole, the transcriptional profiles are very similar between both growing cell lines for most studied genes (**Fig. I-3**). Both ferritin subunits are the most abundant mRNA among the studied IRP targets, more than one order of magnitude above the level of the reference gene hPRT. Ferritin transcripts are approximately 2-times more abundant in K562 than in KG1 cells. Other genes such as those of TfRC, heme oxygenase 2 (HMOX2, constitutive isoform), and of both IRPs were nearly equally expressed in both leukemic models. ALAS2 and the globin genes were hardly or not detected in KG1 cells, whereas the gene of heme oxygenase-1 (HMOX1, inducible isoform) was weakly but significantly expressed. In the case of K562 cells, globin genes clearly showed up together with the gene encoding EpoR. This is a clear sign of more engaged cells in the erythroïd lineage as compared to KG1 cells (**Fig. I-3A**, *white histogram bars versus Fig. I-3B*). The high expression level of γ -globin which increases upon hemin-induced maturation has been previously evidenced in these cells (*Charnay and Maniatis, 1983*). In K562 cells, HMOX1 was less expressed and DMT1 was more expressed than in KG1 cells.

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

A.



B.

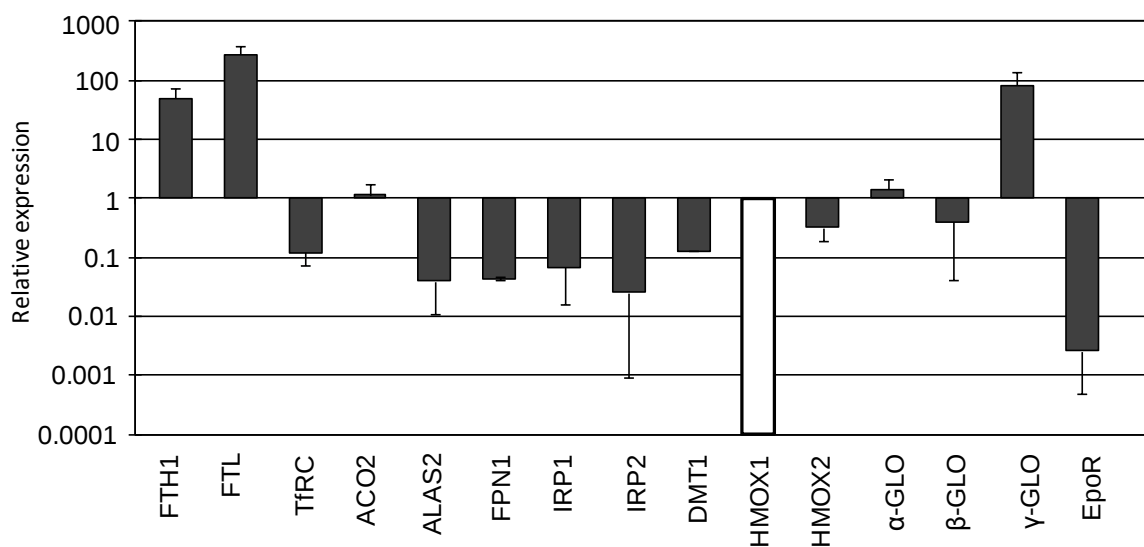


Figure I-3. Relative expression of several mRNAs belonging to the iron network of proliferating cells or measured for comparison (e.g. HO-2).

Mean and standard deviation of transcript expression relative to the reference gene hprt for **(A)** KG1 and **(B)** K562 cell lines. The white histogram bars are considered as transcripts of very low abundance with Cq in the 35- 40 range (see absolute quantifications below).

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

After iron withdrawal, cells stopped growing but they kept a similar transcriptional profile as a whole for the set of monitored genes. In K562, significant changes for HMOX1, which decreased upon iron withdrawal, and increase of TfRC were observed: the HMOX1 down-regulation may be assigned to scavenging of the catalytic iron for oxidative reaction, such as the Fenton one. In the case of TfRC in K562 cells, the lack of large variations of other mRNA combined with the selective increase of the TfRC mRNA (data not shown) can be taken as the sign of IRP stabilization of the transcript .

Table I-4. Absolute transcript quantification in cell lines.

	[mRNA] /cell (min-max)			
	KG1		K562	
hPRT	77 - 224	pM	9 - 221	pM
FTH1	1.6 - 3.3	nM	0.8 - 5.7	nM
FTL	3.8 - 425	pM	445 - 1250	pM
TfRC	0.93 - 73	pM	10 - 72	pM
ACO2	22 - 1315	pM	0.83 - 7.1	nM
ALAS2	<0.1	pM	1.2 - 525	pM
FPN1	<0.1	pM	3.5 - 76	pM
FPN1*	<0.5	pM	3 - 93	pM
DMT1*	26 - 194	pM	1.7 - 13	pM
IRP1	0.3 - 79	pM	0.5 - 47	pM
IRP2	1 - 46	pM	1.2 - 11	pM

(*) mRNA forms without IRE sequence

Other RT-qPCR experiments were carried out after transfecting the cell lines with the IRE-*luc* bearing plasmids later used in this work. In none of these cases, the levels of the studied mRNA were changed, implying that transfection does not significantly impact transcription of the corresponding genes. Furthermore, by comparing amplification of genes of interest in non-transfected cells with that of a *luc*-bearing plasmid added to the qPCR mix, it was possible to measure absolute amounts of mRNA in the PCR reaction.

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

From these data, the concentrations of mRNA were deduced as detailed in the Experimental section. The results of these determinations are reported in **table I-4** as cellular mRNA concentrations to allow easy comparison with other concentration values.

2.4.4 Efficiency of the Iron Regulatory Proteins to repress translation by Iron Responsive Elements

As an attempt to clarify the way IRP1 acts on IREs in myeloid leukemic cells, the relative efficiencies of the endogenous IRP system to regulate the translational control of transfected IRE-*luc* constructions were recorded. Two plasmids were built for each tested IRE, and these IREs are listed in **table I-2**. The IRE sequences were cloned immediately upstream of the sequence encoding firefly luciferase (*luc*) on pGL3-control. Plasmids bearing the IRE sequence in both directions were selected by sequencing, so that one, IRE 5' → 3' upstream of *luc*, could be recognized by IRP, whereas the other, the reverse complementary IRE sequence, could not, despite being folded similarly to IRE with a stem-loop structure (**Fig. I-S1**). With these constructions, it is anticipated that the plasmid with the reverse complementary IRE sequence provides a convenient negative control to the positive IRE one. Indeed, plasmids with other mRNA structures upstream of the sequence encoding firefly luciferase (*Henderson et al., 2005; Li et al., 2004; Wang et al., 2007*), particularly those devoid of a stem-loop, can hardly be compared with IRE-containing ones. As evidence of this statement, in preliminary experiments the luciferase activity measured from the transfected pGL3-control plasmid was higher than the activity generated by any of the IRE(+) or reverse complementary IRE-containing plasmids. Thus, taking the pGL3-control plasmid as reference would enhance the apparent repression of IRPs on the IRE-containing mRNA without considering the structural differences between the constructions being compared.

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

Growing cells

Plasmids with IRE in each direction were used separately to transfect cells, together with a plasmid encoding *Renilla* luciferase used to normalize transfection efficiency (**Fig. I-S1**). Luciferase activities of both *Renilla* and firefly were measured 24 hours after transfection. Since IRP binding should repress the firefly luciferase activity in cells transfected with the plasmid bearing the IRE in the correct orientation, designated IRE (+), the corresponding value is used as denominator. The numerator is that for the plasmid with the same IRE in the reversed direction, IRE (-). Thus IRP binding is detected as a value > 1 for the IRE(-) / IRE (+) ratio.

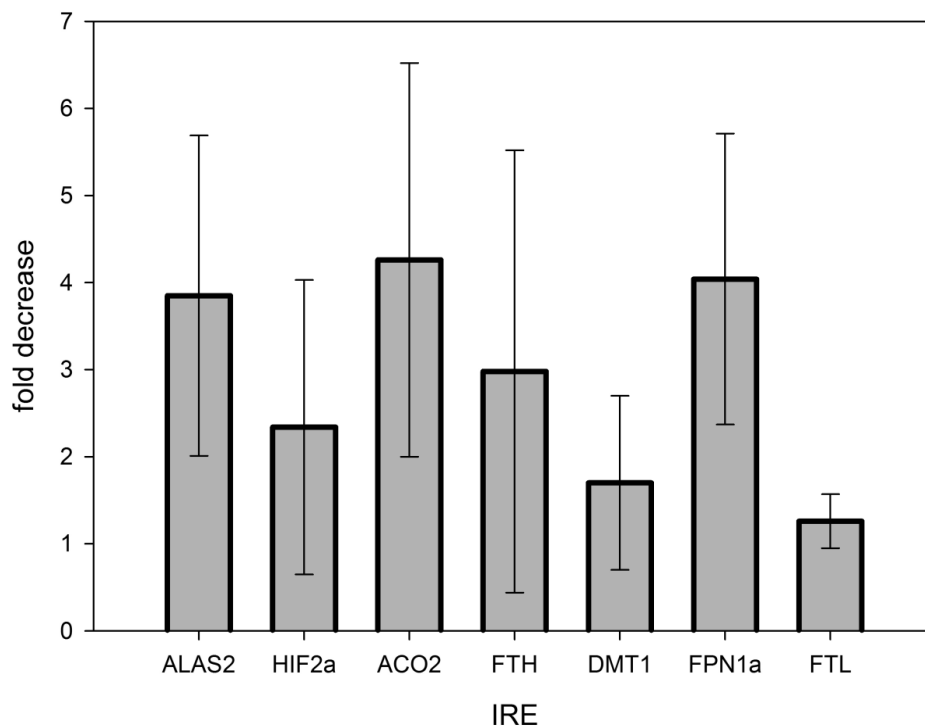


Figure I-4. Regulation operate by endogen IRP on introduced IRE.

Both luminescent signals (REN/FIR) were sequentially measured in cellular extracts of transfected cells. The IRE(-) / IRE (+) luminescence ratio was calculated after normalization with the Renilla signal. Ratios above 1 correspond to repression of IRE by endogenous IRP. This ratio is represented for each studied IRE.

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

The IRE(-) / IRE(+) ratio was measured for the IREs listed in **table I-2** in two different cell lines, K562 and KG1. The mean values and SD were not significantly different in these two contexts, which led us to combine all data. In doing so, differences on the efficiency of the repression induced by the different IRE on the dependent luciferase activity were observed (**Fig. I-4**). The largest ratios were for the IRE of erythroid aminolevulinate synthase (ALAS2), of mitochondrial aconitase (ACO2), and of the splicing form of ferroportin (SLC40A1) bearing an IRE (FPN1a) with means around 4. The IREs of hypoxia inducible factor 2 α (HIF2 α), of the ferritin subunits (FTH1, FTL), and of the IRE-bearing forms of the divalent metal transporter (SLC11A2, DMT1) were all above 1, but the repression was weak. Last, the constructions with the second IRE of the transferrin receptor 3'UTR (TfRb), that of the α -hemoglobin stabilizing protein (AHSP), and of the cell division cycle 14A (CDC14A) failed to evidence any regulation of the luciferase activity, and they were not studied further. Note however that these IRE naturally occur on the 3'UTR of the mRNA they regulate, whereas they are cloned here in the 5'UTR of *luc*, i.e. in a different messenger configuration.

Iron-depleted cells

The above data were obtained with growing cells. As the IRP system is sensitive to iron availability, cells were deprived of iron by adding desferrioxamine (DFO) for 24 h before transfection with the IRE-bearing plasmids. It has been show above that the DFO treatment enhances the IRP1 activity, without major contribution of IRP2 in the cells under study. Surprisingly, the enhancement of endogenous IRP activity did not translate into any significantly larger repression of the luciferase activity with any of the IRE shown in **Fig. I-4**. This is taken as an indication that the exogenous IRE is not significantly responsive to increase IRP activity in the present experimental conditions. This conclusion is further borne out when treating cells with other anti-proliferative agents instead of desferrioxamine. Cytarabine (1 μ M) was used on KG1 cells and hydroxyurea (200 μ M) on K562 cells to stop

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

proliferation. Neither of these two compounds changed the regulating order measured with growing cells.

2.5 Discussion

The above series of experiments provides one of the first datasets enabling the quantitative assessment of the IRP-IRE regulatory system in the cellular context. Manipulation of the iron provision to the K562 and KG1 cell lines under study revealed all of the IRE-binding activity present in cells via drastic scavenging, as did in vitro unfolding of this activity. This behavior was expected from the currently accepted model of the modulation of the IRP activity (*Wang and Pantopoulos, 2011*), and the present experiments indicate that approximately half of IRP1 is under its IRE-binding form in growing cells. Unexpectedly, IRP2 was not detected in these cells although the tools we implemented to identify it were successful with other cell types or cellular models. Expression of the IRP2 gene (*IREB2*) was modest but its mRNA was easily identified in RT-qPCR experiments. IRP2 is regulated by protein degradation (*Recalcati et al., 2010*), and, without further investigations, it may be proposed that the IRP2 turnover must be particularly efficient in the studied cells and in hematopoietic progenitors in general. Indeed, IRP2 was also not detected in primary CD34⁺ cells from cord blood and bone marrow of healthy donors, and in the blasts of leukemic patients (Pourcelot et al. in preparation, chapter III).

Quantification of IRP1 by Western Blots calibrated with the pure antigen allowed us to estimate the concentration of this regulator in the studied cells. Although these determinations varied between different experiments, probably for technical reasons, the resulting values were around 1 μ M. This is orders of magnitude larger than any of the target mRNAs bearing IRE which were quantified in the low nM range at most, with the ferritin subunits giving the highest values. From these data, it may be inferred that the amount of IRP1 largely exceeds the sum of all IRE mRNAs, unless one considers many of them remain

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

to be identified. Given the availability of the human genome sequence, the potent efficiency of deep sequencing, and the efficiency of the available softwares to screen for specific sequences (the structurally well conserved IRE sequences in the present case), the occurrence of many more IRE-mRNA than the presently known dozen seems unlikely. We thus come to the conclusion that the IRP1 regulator is in large excess over its regulated targets, namely any IRE-bearing mRNA. This conclusion is further borne out by previous measurements carried out with a significant fraction of the transcriptome and proteome of a mouse fibroblast cell line, in which the protein and mRNA concentrations of IRP1, both ferritin subunits and transferrin receptor 1 were reported (*Schwanhäusser et al., 2011*): only the IRP1 protein concentration was ca. 10-fold higher in our measurements than in this previous study employing another cell model.

Although surprising, the large excess of IRP1 over its targets is not without precedent in other cells. In HeLa cells, manipulations of the amounts of both IRPs by siRNA technology established that loss of IRP regulation on ferritin and transferrin receptor messengers could only be observed when the remaining mRNA of IRPs was only a few percent of the concentration in starting HeLa cells with undetectable amounts of the IRPs with the implemented tools (*Wang et al., 2007*). In other words, the regulation by IRPs is maintained with a minority of the IRE-binding capacity present in these cells. Thus, both the results of this study (*Wang et al., 2007*) and those presented herein point to a regulator/regulated items ratio larger than 10, which cannot be easily reconciled with other quantitative data obtained in vitro on this system. For instance, the dissociation constants reported for binding of IRPs to IRE were in the 5-130 pM range (*Barton et al., 1990; Goforth et al., 2010; Haile et al., 1989*). This implies that a 10^2 -fold excess of IRP on IRE would leave far less than one mRNA molecule/cell not involved in the complex with IRPs in the studied cells with a K_d of 100 pM. Thus, no translation of the mRNA with IRE located in the 5' UTR would occur. Even considering that the IRP1 protein concentrations represent the upper limit of the activity (not

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

all protein is always active as IRE-binding), only decreasing it by a large factor would allow translation of 5'IRE-containing mRNAs. Thus the 2-fold difference of activity measured here between growing and iron-starved cells would not change the picture.

A further piece of information comes from the activity data provided here. In contrast to most previous work implementing a similar strategy (*Henderson et al., 2005; Li et al., 2004; Wang et al., 2007*), transfection of KG1 and K562 cells with plasmids encoding the firefly luciferase activity under the dependence of various naturally occurring IRE displayed minor regulation, and none for some of these IREs. A reason to explain the discrepancy may be a technical one, as the luciferase activity measurements were referred here to control transfected cells with similar structure of the *luc* 5' region, instead of other unrelated references in other studies. None of the previous work was carried out in hematopoietic progenitors. Yet, the very weak or absence of endogenous IRP regulation of the exogenous IREs contrasts with the excess of IRP over the mRNA produced by the transfected plasmids. The latter was measured at 100 pM on average, i.e. within the range found for endogenous IRE-bearing mRNA. It implies that very little of the IRP present in these cells could be mobilized to bind to the added IRE. At most the 4-fold inhibition observed with some IREs (ALAS2, ACO2, FPN1a) would be due to the binding of only a tiny fraction (75 pM if the added IRE is 100 pM) of the available IRP1, and far less for the other IREs used in this work. Of note, the sensitivity to endogenous IRP of the different IREs *in cellulo*, as measured here, is different, and almost reverse, from what might have been deduced from *in vitro* evaluation with recombinant IRP1 (*Goforth et al., 2010*). This work reported the FTL > FTH1 > FPN1a > HIF2 α > ALAS2 > ACO2 order of apparent affinities. Without further information, we assign the difference to unclear factors that seem to modulate the IRP activity in cells and that are not interfering *in vitro*.

This interpretation agrees with previous conclusions reached by other means (*Wang et al., 2007*) in that the cellular IRE-binding activity may differ from that estimated by *in vitro* gel-

Chapitre 1: Caractérisation du système IRE-IRP de la cellule leucémique

shift assays. As the observations reported here seem consistent with the few related studies found in the literature, it may also be relevant to other cell types with some likely quantitative differences. In a general physiological perspective, it remains to be seen whether the discrepancy between the large amount of cellular IRP and its apparent marginal involvement in IRE-binding is a general property of mRNA-specific metazoan translational regulators. The need for excess mRNA binding capacity may make sense if the (regulator-regulated mRNA) complex affords only partial regulation. For instance, the repression of 5'IRE-mRNA translation by IRP binding (*Muckenthaler et al., 1998*) may be due to impairment of the building of the proper translation initiation complex, but the dynamics of the system (the actual dissociation constants of the IRE-IRP complexes interacting with the ribosomes are not precisely known) may allow some “leakage” allowing translation. Thus, excess of the regulator would be requested for efficient repression. Despite the small dissociation constants measured in vitro for the IRE-IRP complexes, the dynamic nature of the system, as reviewed in (*Theil, 2015*), is exemplified by the observation that Fe^{2+} appears to balance the propensity of IRE-containing mRNA to bind to IRP or to eIF-4F complex. Other arguments could also be proposed when IREs lie on the 3'UTR to rationalize the need for high IRP/IRE ratios for proper regulation.

Despite the apparently large regulatory potential of endogenous IRPs, distinct phenotypes have been observed in model animals lacking one of them. In particular, mice devoid of IRP1 displayed polycythemia and those without IRP2, microcytic anemia (*Zhang et al., 2014*) for review). Reciprocally, IRP1 gain of function also perturbed erythropoiesis (*Casarrubea et al., 2013*). Thus, the proper balance between IRP and IREs is requested for normal hematopoiesis, and the quantitative data for models of the relevant cells presented here should help progress in understanding the detailed mechanisms at work in such situations. Furthermore, whether impaired IRP regulation is associated with pathological hematopoiesis will be the subject of future studies.

2.6 Acknowledgement

This work was supported by grants from *Région Rhône-Alpes* (Programme Cible 2010), *Institut Rhône-Alpin des systèmes complexes (IXXI)*, *Université Joseph Fourier Grenoble* (Programme Agir 2013), *Direction de la Recherche Clinique (DRC) CHU Grenoble*, and Novartis. The company played no role in the design and the interpretation of the results. EP is the recipient of a grant from the *Société Française d'Hématologie (SFH)*.

2.7 Supplementary material

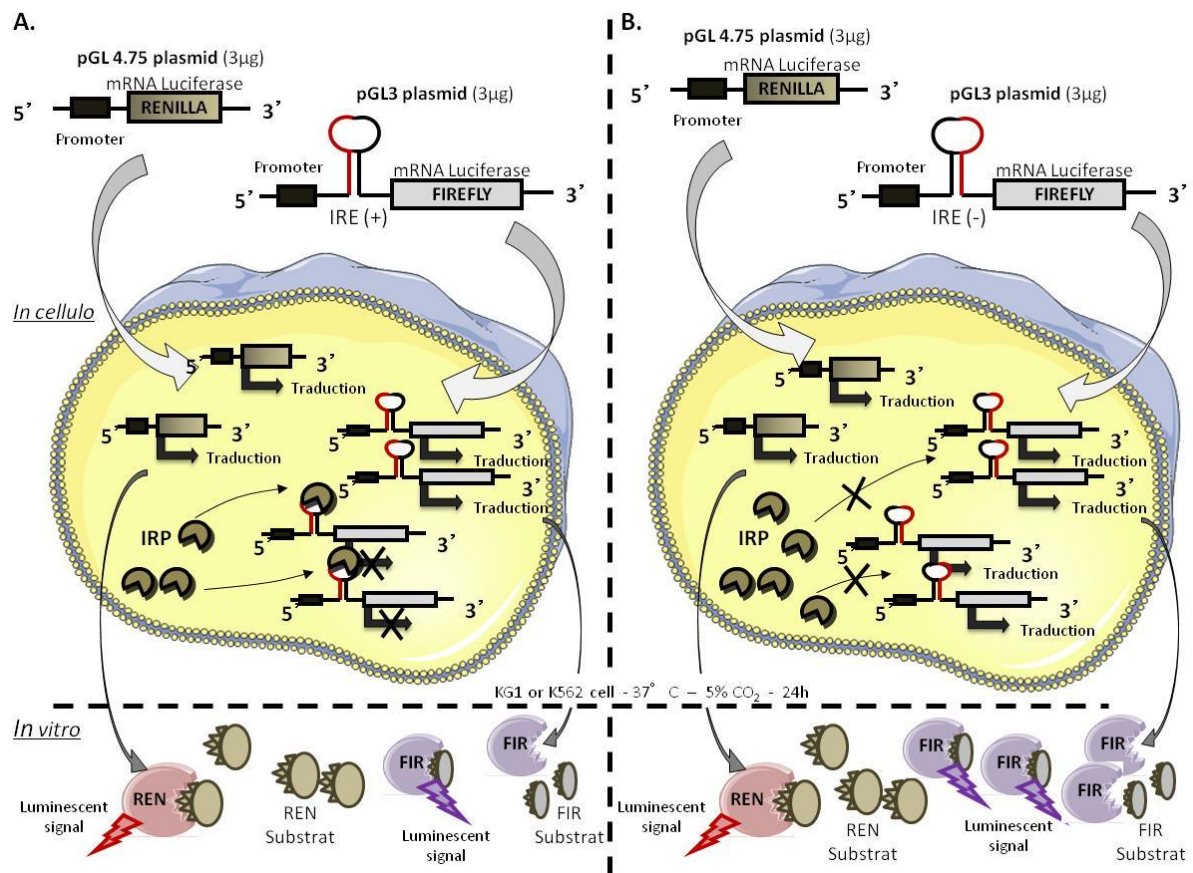


Figure I-S1. Method for measurement of regulation operated by endogenous IRP on exogenous IRE

The binding of the endogenous IRP to regulate translational control on IRE was carried out for 24h *in cellulo* before breaking cells and measurement. For both cell lines and for each studied IRE, two transfections were done in parallel: **(A)**. Transfection of the pGL3 plasmid with the cloned IRE of interest (IRE (+)) upstream of the sequence encoding Firefly (FIR) luciferase and **(B)**. Transfection with the same plasmid as in A but with the reverse IRE sequence (IRE (-)) unable to bind IRP, and thus used as negative control. In both cases a second plasmid bearing the sequence encoding Renilla (REN) luciferase, pGL4.75, was transfected as control of transfection efficiency.

*Chapitre II : Concentration fonctionnelle
en fer dans les progéniteurs
hématopoïétiques et deux lignées
leucémiques humaines*

Concentration fonctionnelle en fer dans les progéniteurs hématopoïétiques et deux lignées leucémiques humaines

1. CONTEXTE

A travers les précédents résultats, il a été démontré que le système étroit de régulation de l'homéostasie du fer que constitue le système IRE-IRP est parfaitement actif, fonctionnel et sous la dépendance de la concentration en fer dans les modèles leucémiques étudiés. Les arguments rassemblés montrent également l'excès de régulateurs IRP1 présent dans ces cellules face aux quantités de cibles à réguler. Or c'est la concentration en fer intracellulaire qui va permettre la modulation d'IRP 1 sous forme aconitase avec le cluster fer-souffre en IRP 1 liant les cibles IRE des ARN messagers. Cette concentration en fer conditionne l'activité du système régulateur IRE-IRP dont les cibles participent à l'établissement des conditions nécessaires à la prolifération cellulaire ou à la différenciation, voire à la quiescence ou la mort. Toutefois les concentrations pertinentes de métal n'ont jamais été évaluées précédemment. Il est supposé que lors du développement de néoplasmes les quantités de fer mobilisables sont modifiées pour satisfaire la croissance cellulaire et notamment la croissance du clone leucémique dans le cadre des leucémie aiguë myéloïdes. On est alors en droit de se demander si la gestion du fer entre les cellules de ces modèles leucémiques et des cellules progénitrices hématopoïétiques normales passe par un seuil de sensibilité au fer différent. Ces modèles leucémiques bien que tous deux très prolifératifs présentent tout de même une différence dans leur temps de doublement, on peut se demander si au sein même des différents types leucémiques les seuils de sensibilité au fer diffèrent.

1.1 Les mesures de fer intracellulaire

A ce jour la concentration en fer total intracellulaire est aisément réalisable par les techniques de spectrométrie de masse, et est déterminée pour un grand nombre de type cellulaire avec ainsi une estimation moyenne entre 50-100 μ M (*Cabantchik et al., 2002*). Il est toutefois beaucoup plus difficile de parvenir à mesurer les différentes formes du métal de part la multiplication de ces formes, leur évolution dynamique et

leur localisation dans les différents compartiments cellulaire. De nombreuses équipes de recherche cherchent à estimer la fraction dit toxique de fer pour la cellule, représenté par le fer non lié à la transferrine (NTBI: non-transferrin bound iron). Parmi ces formes de NTBI, le labile iron pool (LIP) correspond à un pool fer pouvant être chélaté, et considéré comme transitoire au sein de la cellule. En effet, il permettrait de fournir du fer pour la biosynthèse de l'hème, des clusters fer-soufre au niveau de la mitochondrie ou pour les réactions enzymatiques fer dépendante au niveau cytoplasmique, tout en étant renouvelé par l'apport de fer extracellulaire afin de maintenir un équilibre. Il représente une fraction mineure du fer totale de la cellule, c'est à dire environ 5%. Ce pool est également considéré comme le senseur de l'activation du système IRE-IRP, et un important catalyseur de la formation des espèces réactives de l'oxygène (*Cabantchik et al., 2002; Epsztejn et al., 1997*). La méthode de mesure actuellement la plus répandue consiste à utiliser une sonde, la calcein acetoxymethyl ester (CA-AM), fluorescente après diffusion passive et hydrolyse par une estérase puis capable de lier le fer intracellulaire, ce qui a pour conséquence une extinction de l'émission de fluorescence. Puis, par l'ajout d'un chélateur ayant une pénétration intracellulaire, la chélation du fer libère la calcéine de sa liaison ce qui conduit à une émission de fluorescence. La différence de fluorescence reflète le LIP. Ces mesures font donc intervenir un élément extérieur à la cellule, et dont l'introduction peut induire des modifications des équilibres des divers composants intracellulaire, d'autant plus que la nature exacte des éléments fixés n'est pas clairement définie.

Notre approche pour mesurer la concentration en fer nécessaire à la transition de l'état de quiescence à un état prolifératif n'est pas dépendant de l'introduction d'éléments extérieurs à la cellule mais repose uniquement sur la mesure de paramètres endogènes. Ainsi, l'accumulation des données de mesure de densité, d'évolution du cycle cellulaire, de mesure de concentration intra-cellulaire en fer, d'activation des IRP, et d'évolution de la concentration des protéines régulés par le système IRE-IRP sur les modèles cellulaires utilisés après carence et ré-apport de transferrine saturée permettent de converger vers un intervalle de concentration assez étroit conjuguant reprise de la croissance avec un déblocage en phase G0/G1 du cycle, augmentation du

fer intra-cellulaire et diminution de l'activité du système régulateur IRE-IRP. Cet intervalle correspond au seuil de sensibilité au fer des protéines IRP et définit la concentration fonctionnelle en fer de ces cellules.

1.2 La concentration fonctionnelle en fer une donnée d'intérêt en thérapeutique

La connaissance du niveau de fer suffisant aux besoins cellulaires présente un intérêt dans les pratiques cliniques. Ainsi, dans les cas de transfusions répétées, rencontrés par exemple dans les myélodysplasies, l'utilisation de cette estimation du seuil pourrait permettre une meilleure adaptation du niveau de chélateur afin d'assurer un maintien de l'homéostasie du fer en minimisant les risques de stress cellulaire et d'évolution maligne. La pratique actuelle nécessite un suivi constant des doses de chélateurs qui peuvent, sur le long terme, causer des atteintes oculaires, auditives, rénales et hépatiques (*Chaudhary and Pullarkat, 2013*). C'est également le cas dans les LAM où le traitement par chélateur est envisagé. Dans de telles pathologies où l'on recherche un ré-engagement de la différenciation, il sera d'autant plus important d'avoir un bon ajustement de la dose de chélateur que, comme nous l'avons vu précédemment, cette différenciation est sensible au potentiel redox, qui dépend de la concentration et du temps d'exposition au chélateur (*Chaston et al., 2004*). La meilleure approche du seuil de fer soutenant la prolifération cellulaire dans des conditions cliniques permettrait également d'estimer la supplémentation en fer adéquate à apporter aux patients souffrant d'anémie, d'insuffisance rénale ou toute autre pathologie marquée par une carence en fer. En effet à ce jour la quantité de fer apportée dans ces pathologies est basée sur des essais cliniques qui ne prennent en compte que, d'une part, le taux de fer plasmatique, qui correspond aux apports possibles aux cellules, et d'autre part, la ferritine plasmatique qui témoigne des réserves disponibles mais n'est pas exempte d'interférences. Ce sont ces deux paramètres qui sont utilisés pour le suivi et l'adaptation posologique car il faut éviter la toxicité qu'induirait une surcharge en fer. La prise en compte de la corrélation apport/comportement cellulaire, tel qu'abordé ici, pourrait permettre une meilleure adaptation du schéma posologique de la supplémentation en optimisant le but recherché (besoin physiologique) et en diminuant les effets potentiellement délétères.

2. ARTICLE

Iron for proliferation of cell lines and hematopoietic progenitors: nailing down the intracellular functional iron concentration

Accepted in Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research

2015 Mar 27;1853(7):1596-1605. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.03.009. [Epub ahead of print]

Emmanuel Pourcelot^{a,b,d,f}, Marine Lénon^{a,b}, Nicolas Mobilia^f, Jean-Yves Cahn^{e,f}, Josiane Arnaud^{a,b,g}, Eric Fanchon^f, Jean-Marc Moulis^{a,b,c*}, Pascal Mossuz^{d,f}

^aUniversité Grenoble Alpes, Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics, and Environmental and Systems Biology, Grenoble, France

^bInserm, U1055, Grenoble, France

^cCommissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives – Institut de Recherches en Technologies et Sciences du Vivant, Grenoble – France

^dCHU Grenoble, Laboratoire d' Hématologie, Institut de Biologie et Pathologie, Grenoble – France;

^eCHU Grenoble, Clinique d'hématologie, Grenoble – France

^fUniversité Grenoble Alpes, TIMC – Imag CNRS 5525, Grenoble – France

^gCHU Grenoble, Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie, Grenoble, France

keywords: iron homeostasis; post-transcriptional regulation; leukemia; cellular growth; cell cycle; modeling

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests

2.1 Abstract

Iron is an essential nutrient which must be provided in sufficient amounts to support growth of eukaryotic cells. All organisms devote specialized pathways to ensure proper delivery. Yet, a quantitative assessment of the intra-cellular iron concentration needed to allow the cell cycle to proceed in mammalian cells is missing. Starting from iron-depleted cell lines or primary hematopoietic progenitors prepared with clinically implemented iron chelators, replenishment via transferrin and other iron sources has been quantitatively monitored through the main endogenous markers of the cellular iron status, namely proteins involved in the uptake (transferrin receptor), the storage (ferritin), and the sensing (Iron Regulatory Proteins) of iron. When correlated with measurements of iron concentrations and indicators of growth, this minimally intrusive approach provided an unprecedented estimate of the intracellular iron concentration acting upon iron-centered regulatory pathways. The data were analyzed with the help of a previously developed theoretical treatment of cellular iron regulation. The minimal cellular iron concentration required for cell division was named *functional iron concentration* (FIC) to distinguish it from previous estimates of the cellular labile iron. The FIC falls in the low nanomolar range for all studied cells, including hematopoietic progenitors. These data shed new light on basic aspects of cellular iron homeostasis by demonstrating that sensing and regulation of iron occur well below the concentrations requiring storage or becoming noxious in pathological conditions. The quantitative assessment provided here is relevant for monitoring treatments of conditions in which iron provision must be controlled to avoid unwanted cellular proliferation.

List of Abbreviations

Acute myeloid leukemia (AML); bovine serum albumin (BSA); deferiprone (3-hydroxy-1,2-dimethyl-4-pyridinone, DPF); deferoxamine (DFO); erythropoietic stimulating agents (ESA); ethylene-diamine tetracetate EDTA; ferric ammonium citrate (FAC); functional iron concentration (FIC); inducible heme oxygenase (HO-1); Iron Regulatory Proteins (IRP); labile iron pool (LIP); myelodysplastic syndrome (MDS); N-myc downstream regulated 1 NDRG1; Phosphate Buffered Saline solution (PBS); poly(rC) binding proteins (PCBP); reactive oxygen species (ROS); transferrin (Tf)

2.2 Introduction

Iron is required to maintain viability and to support growth of almost all kinds of cells. In eukaryotes, it is abundantly present in the electron-transfer centers of the mitochondrial respiratory chain, for instance, and, more generally, it participates at the active sites of a myriad of proteins and enzymes. Consequently, iron is mandatory for cellular proliferation (*Le and Richardson, 2002*) and iron removal from the growth medium generally stops the cell cycle at the G1/S transition. One contributing factor to this blockade is the iron-dependent enzyme ribonucleotide reductase, which relies on a subunit containing a tyrosyl-di-iron cofactor (*Cotruvo and Stubbe, 2011*). The arrest of the cell cycle induced by iron chelators justifies considering these compounds as anti-neoplastic agents (*Merlot et al., 2013*).

In metazoans, the most iron demanding pathway is erythropoiesis since iron is the anchoring site of oxygen in hemoglobin, a protein supplying oxygen to tissues. Iron-deficient individuals suffer from anemia, in which not enough iron is incorporated into nascent hemoglobin and which is the most widespread single nutrient deficiency worldwide (*McLean et al., 2009*), (WHO micronutrient def 2014). Iron provision for hematopoiesis is delivered by transferrin (Tf), a circulating glycoprotein which can be easily measured together with its iron load to gauge the iron status. Although the critical levels of this useful biomarker have been set a long time ago, it remains unclear how much Tf-delivered iron is needed to support proliferation of cells that must divide to maintain homeostasis or to fulfill specific functions. Throughout hematopoiesis, cells must properly handle iron according to the specific requirements of the different stages, from renewal of stem cells to full differentiation of specialized blood components (*Zon, 2008*).

Cells need to maintain the proper level of iron availability, and this requirement is challenged in transfusion-induced iron overload or, conversely, by neoplasm-triggered large iron consumption. The former situation occurs in cases of thalassemia (*Ginzburg and Rivella, 2011*) and myelodysplastic syndromes, (*Shenoy et al., 2014*) for instance. The latter applies to cancer cells in general, acute myeloid leukemia clones in particular, for which ample iron

provision is needed to support growth, particularly in the blast crisis. The pivotal role of iron in such circumstances has recently been clearly evidenced by the redirection of proliferating blasts into the monocyte lineage with a treatment including iron chelation (*Callens et al., 2010; Paubelle et al., 2013; Roth et al., 2012*).

To clarify conditions under which cell proliferation occurs, the quantitative iron needs of model cell lines and of hematological progenitors for amplification have been evaluated herein. The implemented integrative approach minimally perturbed cells, and it allowed us to show that proliferation is supported by smaller amounts of iron than assumed before. With the help of a recently developed theoretical model of cellular iron homeostasis, these data should help understand the role of iron deregulation in a wealth of pathological conditions, and they will have to be considered for a better implementation of the therapeutic strategies targeting iron-dependent pathways.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Reagents

All reagents were obtained from Sigma-Aldrich unless stated otherwise. Human holo-transferrin (*i.e.* iron-loaded transferrin, Sigma T4132) was iron saturated with 2 Fe atoms/molecule. The iron content of human apo-transferrin (apo-Tf), *i.e.* the protein devoid of iron, was measured by inductively coupled plasma-mass spectrometry at less than 0.025 iron atom/transferrin molecule. Recombinant human Iron Regulatory Proteins (IRP) 1 and 2 were obtained as previously detailed (*Brazzolotto et al., 1999; Dycke et al., 2007*).

2.3.2 Cell lines

The cell lines used in the present study originated from the ATCC biological resource. The human myeloid leukemia KG1 and K562 cells were grown in RPMI-1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest, origin: South America, batch containing 1.7 mg of iron/L), 1% L-glutamine, 100 U of penicillin/ml and 0.1 mg streptomycin/ml at 37°C with 5% CO₂. As a rapidly growing cell model significantly different from the above cell lines,

Chapitre 2: Concentration fonctionnelle en fer

HeLa cells were routinely maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented as above for leukemic cell lines. The iron-containing DMEM was replaced by RPMI after iron depletion for direct comparison of the iron-requirements of the HeLa cells as compared to the other cells used in this work.

2.3.3 Purification of CD34⁺ progenitors

CD34⁺ cells were obtained from cord blood after Ficoll-Hypaque (Abcys - Eurobio) density gradient separation and they were isolated by two steps of immunomagnetic separation (Miltenyi Biotec), on large then medium size columns, successively. Cord blood procedures were approved by the French Blood Service's Institutional Review Board, and samples were obtained from healthy donors who gave informed consent.

2.3.4 Iron depletion and proliferation assay for cell lines

After routine maintenance in rich media, cell lines were handled in a minimal medium composed of RPMI-1640, 1% treated (see below) bovine serum albumin (BSA), 30 nM sodium selenite, 1% L-glutamine, 100 U of penicillin/ml and 0.1 mg streptomycin/ml at 37°C in 5% CO₂. In the case of HeLa cells, the minimal medium was used after adhesion in the conventional rich medium. To remove as much iron as possible, the BSA powder was dissolved in 10 mM HEPES buffer pH 7.3 containing 5 mM EDTA before dialysis with successive baths of distilled water until reaching an EDTA concentration below 1 nM. Beforehand, distilled water was filtered through Chelex cation exchange resin (BioRad). The BSA concentration was estimated by spectrophotometry at 280 nm ($\epsilon = 39600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Cells were seeded at 5×10^5 cell/mL in minimal medium without added iron or Tf, and the chelating agent was added for 24 h. Deferoxamine mesylate salt was used at 200 μM and deferiprone at 500 μM . The depletion medium was replaced by the minimal medium supplemented with the wanted source of iron. Cells were further kept for 24 h, which is the optimum duration to measure growth at low iron concentrations before cell death, and the cells were then processed. Viable cells were determined by Trypan blue staining and quantified with a LunaTM counter (Logos).

2.3.5 Amplification, iron depletion, and proliferation assay for CD34 cells

A synthetic minimal medium was used to control iron supply. It was composed of Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Life Technologies), 1% iron-depleted albumin (as described above), 200 µg/mL insulin, 0.1 mM β-mercaptoethanol and the StemMACS HSC expansion cocktail (TPO/FLT3/SCF - Miltenyi Biotec) at 37°C in 5% CO₂. Freshly isolated CD34⁺ cells were seeded at 1 x 10⁵ cells/mL and amplified for three days in the above minimal medium supplemented with 1.25 µM holo-Tf. Iron depletion and further experiments were carried out in the same medium in which the iron source was precisely monitored. Viable cells were determined by Trypan blue staining in Neubauer slides.

2.3.6 Cell cycle assays

Cells were rinsed and suspended at 3 x 10⁶ cells/mL in Phosphate Buffered Saline (PBS) solution. They were fixed by slowly adding cold ethanol up to 50% (v:v) with thorough mixing. The suspension was left at 4°C for one hour, the cells were centrifuged, washed with cold PBS, and suspended in PBS (4 x 10⁶ cells/mL). RNA were degraded by 0.5 mg/mL RNase A (Thermo Scientific) at 37°C for 1 h, and cells were labeled by 10 µg/mL propidium iodide. The fluorescence was measured by flow cytometry with the LSR FortessaTM cell analyzer (Becton Dickinson) using the 488 nm sapphire laser. The data were analyzed with the Modfit LT v3.2 software (Verity Software House).

2.3.7 Iron measurements

Iron concentrations were determined by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) using a XSERIES 2 analyzer (Thermo Scientific). Cellular pellets were suspended at 4000-8000 cells/µL of water. The volume corresponding to 8 x 10⁵ cells was diluted (1:25) and mixed (1:1 v/v) with 1% nitric acid before analysis. Raw results were converted to cell associated concentrations by considering the estimated volumes of KG1 and K562 cells, 0.8 and 2.5 pL, respectively, in agreement with previously published values for the latter (*Lipka et al., 2012*). Gallium was used as internal standard. For iron measurements in the growth media, 100 µL were directly treated with acid before analysis.

2.3.8 IRP activity measurement

IRP1 and IRP2 RNA-binding activities were measured by electrophoretic mobility shift assays with 3 µg of total protein extracts. The minimal sequence of human ferritin H-chain Iron Responsive Element (IRE) (*Brazzolotto et al., 1999*) was biotin-labeled with biotinylated cytidine (bis)phosphate using T4 RNA ligase (Thermo Scientific). The IRE-IRP reaction was carried out as previously described (*Brazzolotto et al., 1999*) and the complexes were separated on non-denaturing 4% PAGE in 0.5X TBE, transferred onto Hybond™ N⁺ membrane (GE Healthcare) and the biotinylated bands were detected after interaction with the streptavidin-horseradish peroxidase conjugate by the chemiluminescent luminol product. Quantitation of the signals was done with the Image J software (v1.47, Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA).

2.3.9 Western blotting

Twenty to forty µg of total proteins were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis on 8% or 15% gels, and proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes. For CD34⁺ protein extracts, 8-16% gradient gels (Gene Bio-Application Ltd) were used. The blots were saturated with 10% non-fat milk in PBS-Tween 0.2% and probed overnight at 4°C with antibodies (all produced in rabbit) against IRP1 (1:500) (*Martelli and Moulis, 2004*), ferritin (1:1000, Cell Signaling), heme oxygenase-1 (1:1000, Assay Designs), transferrin receptor 1 (1:1000, Abcam), and actin (1:250, Sigma Aldrich). Following three washes with PBS-Tween 0.2%, the blots were incubated with peroxidase-coupled goat anti-rabbit IgG (Bethyl) at a dilution of 1:5000 for 1h at room temperature, followed by detection with the Pierce ECL western blotting substrate (Thermo Scientific).

2.3.10 Measurement of intracellular reactive oxygen species (ROS)

Intracellular ROS were measured using oxidant-sensitive fluorescent probes. Briefly, 500 000 cells were incubated without or with 200 µM carboxy-dichlorodihydrofluoresceinediacetate acetyl ester (carboxy-H₂DCFDA, Molecular Probes) and 10 µM dihydroethidium (DHE) at

37°C in 5% CO₂ for 30 min. Then cells were washed in phosphate buffer saline before fluorescence measurement with the LSRFortessa™ FACS (Becton Dickinson) cytometer.

2.3.11 Measurement of lipid peroxidation

Cell pellets (7.5 10⁵) were suspended in 0.4% (v:v) thiobarbituric acid, 50% acetic acid, 2mM EDTA, and heated slightly below 100°C for one hour. After cooling in ice the lysate was centrifuged for 10 min at 4000 g. The fluorescence of the supernatant ($\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 595 \text{ nm}$) was measured with the Infinite M200 plate reader (Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland).

2.3.12 Measurements of mRNA

Total RNA was purified from KG1 and K562 cells grown in the absence and in the presence of 200 μM deferoxamine for 24 h. Complementary DNA was synthesized from 1 μg of RNA with modified Moloney Murine Leukemia virus reverse transcriptase (M-MuLV RT, Euromedex #09-11211) and oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer, and diluted 30 fold. It was amplified by real time qPCR (C1000 Thermal Cycler CFX96, BioRad), using validated primers and the HOT Pol Evagreen qPCR Mix Plus (Euromedex).

2.3.13 Statistical analysis

All quantitative variables were expressed as mean. Comparison of data was made using the Mann-Whitney t-test. Statistical analysis was performed using the STATVIEW® software package 5.0.

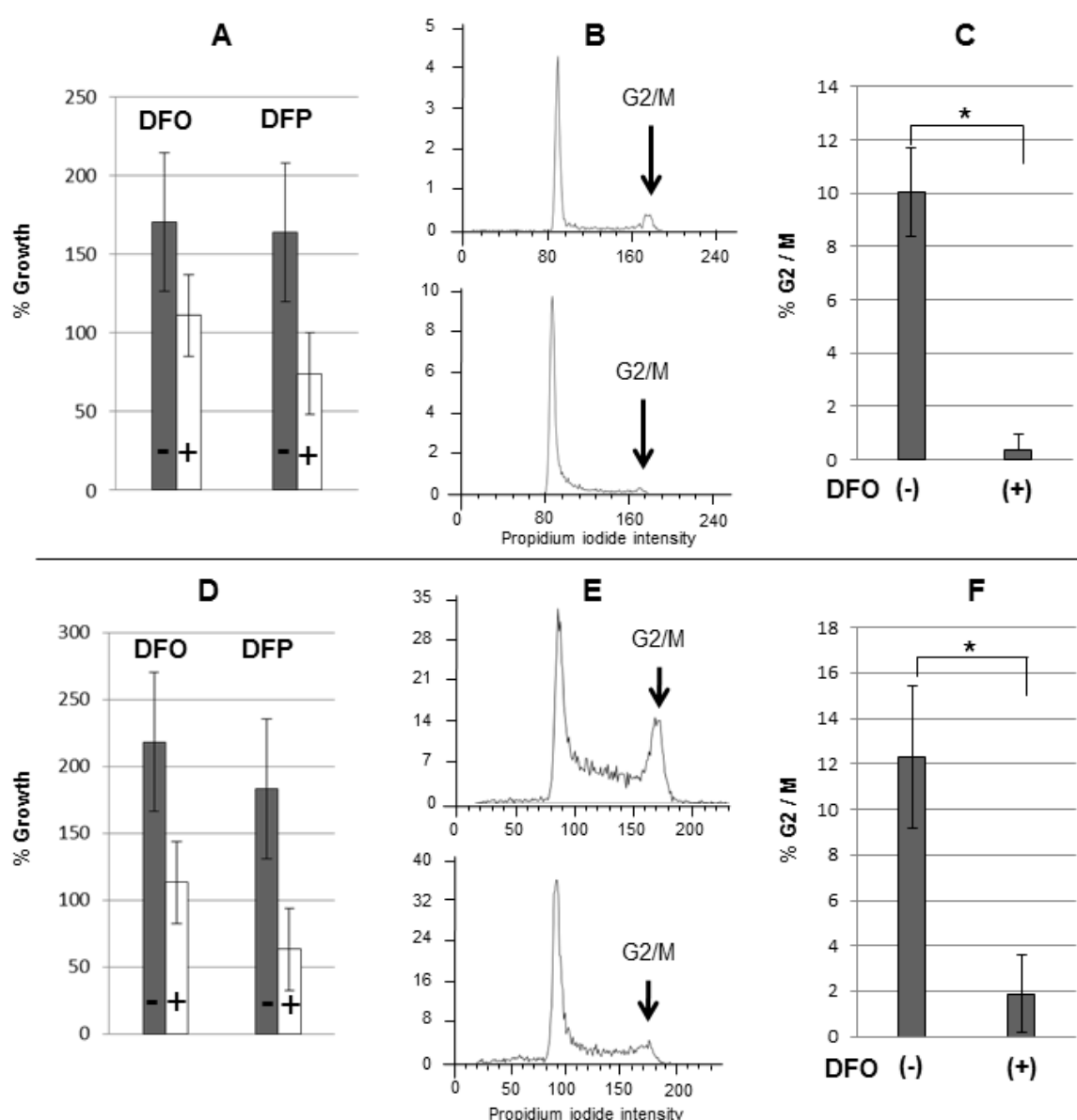


Figure II-1. Comparison of growing and chelator-treated cells.

Top: KG1 cells. (A) The left panel shows the increase of viable cells (%) after 24h in the conventional (serum-containing) growth medium (black bars) and after exposing them to either desferrioxamine (DFO, N=6) or deferiprone (DFP) in the minimal medium devoid of serum (white bars). (B) Representative analysis of the cell cycle before (top) and after (bottom) application of DFO. (C) Percentage of mitotic cells under normal growth conditions (-) and after the DFO-treatment (+) (N=4, * significant difference $p=0.0209$).

Bottom: Same experiments with the K562 cell line (D-F). The difference in the fraction of mitotic cells (F) is significant *, $p = 0.0200$ (N=4)

2.4 Results

2.4.1 Iron withdrawal and growth arrest

The myeloid leukemia cell lines used in this work are fast growing in a complete medium containing bovine serum with endogenous Tf. K562 and KG1 cells were treated with the clinically implemented iron chelator deferoxamine (DFO), with the aim of scavenging the essential metal nutrient in a relatively short time. Preliminary experiments showed that adding 200 μ M DFO to cells growing in complete medium resulted in growth arrest within 24 h. The number of viable cells leveled off after treatment (**Fig. II-1A**) with the disappearance of cells entering mitosis (**Fig. II-1B,C**). Additional experiments using the same DFO concentration for a longer time, up to 72 h, indicated that cells progressively died. When the iron chelator had been added for 24 h, the residual intracellular iron concentration was unable to support growth. But actively growing cells divided for at least one generation when the complete medium without chelator was replaced by a minimal one devoid of iron-loaded Tf (see section 2.4). As expected, the above observations are not restricted to the use of DFO, since a different iron-binding chemical, deferiprone (3-hydroxy-1,2-dimethyl-4-pyridinone, DPF), gave qualitatively similar results (**Fig. II-1**).

The growth arrest induced by chelators was not paralleled by a significant increase of detectable oxidizing species in viable cells (**Table II-S1**). Accordingly, lipid peroxidation was not increased, and heme oxygenase 1 was not induced by the short term application of the chelators (**Fig. II-S1**). Overall, these results indicate that the iron-deprived viable cells do not experience significant oxidative stress.

2.4.2 Iron- or transferrin-triggered recovery from the iron-depleted state

Starting from the iron-depleted situation generated by the 24h-treatment with 200 μ M DFO, iron was added back to the medium without serum and the reversal of growth arrest was monitored by a series of complementary experiments. As can be seen in **Fig. II-2**, and in

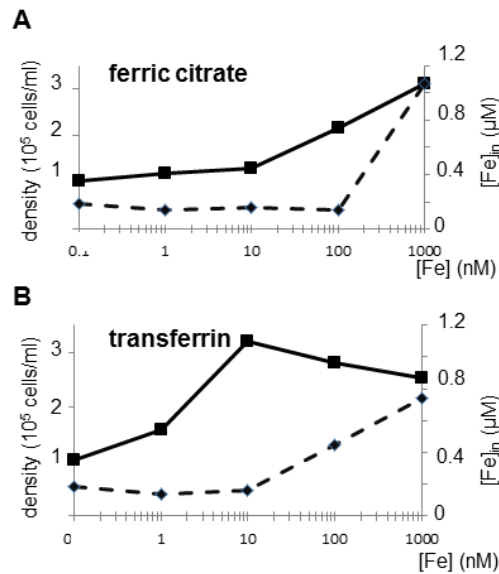


Figure II-2. Cell growth and intracellular iron replenishment of KG1 cells according to the iron source.

Curves with black square marks represent the cell density after 24h in minimal medium, starting from DFO-treated cells at 10^5 cells/ml. Dashed lines with cross marks represent calculated iron concentration associated with cells (see section 2.7): the value measured without added iron ($\text{Fe}=0$) corresponds to *ca.* 20 pmol $\text{Fe}/10^6$ KG1 cells. **(A)** Iron in the minimal growth medium provided by ferric ammonium citrate. **(B)** Same experiment with iron provided by holo-Tf.

agreement with former observations indicating that endocytosis of the Tf-Tf receptor complex is the privileged cellular iron uptake pathway (Ponka and Lok, 1999), Tf was a far better mediator of iron provision to KG1 cells as compared to a simple iron salt such as ferric ammonium citrate (FAC). In these experiments, Tf is a key component of the medium since growth did not resume in the Tf-free minimal medium ($\text{Fe} = 0$ in **Fig. II-2**). At least 10-times more iron provided by FAC was needed to increase the cell number in similar proportions to the situation in which iron is provided by loaded Tf. Yet, in both sets of conditions, viable cells efficiently recovered from the depleted situation without apparent harm and despite the absence of serum.

In the above experimental setting, the amount of Tf and associated iron needed to support growth can be precisely evaluated. Independent determinations in different experiments indicated that growth of K562 cells resumed after 24 h at Tf concentrations between 10 and 20 nM (**Fig. II-3A**). The corresponding value for the KG1 cell line was shifted to below 5 nM fully loaded Tf (**Fig. II-2B**). Accordingly, monitoring the cell cycle indicated that the proportion of G2/M cells progressively increased with the Tf concentration to reach a value similar to that displayed by actively growing cells in the presence of serum (**Fig. II-3A**).

Considering the very low concentrations of Tf added to resume growth, it may be asked whether the effect is driven by added iron or is due to the Tf protein, a strong ferric iron binder of its own. To address this question apo-Tf (the iron-free protein), instead of holo-Tf (with bound iron), was used in the replenishment experiments. Apo-Tf concentrations as low as 15 nM were able to maintain viability of iron-depleted K562 cells for 24 h, and to reinitiate growth as witnessed by the re-appearance of the G2/M peak (**Fig. II-4**). However, viability was not maintained under these conditions, *i.e.* without added loaded Tf, for more than 2 or 3 days. These experiments suggest that apo-Tf can mobilize some non-Tf bound iron brought by the medium or trapped by cells after treatment with the chelator. Yet, most of the non-Tf bound iron cannot be used by cells under these conditions, since viability and growth are supported for shorter duration than in the presence of holo-Tf.

The loss of cells in G2/M was also observed by treating HeLa cells with DFO. After iron depletion, viable cells re-entered the cell cycle (data not shown) as a function of the amount of re-added iron-loaded Tf at low (1-5 nM) concentrations, in a range similar to that observed with KG1 cells (**Fig. II-2**).

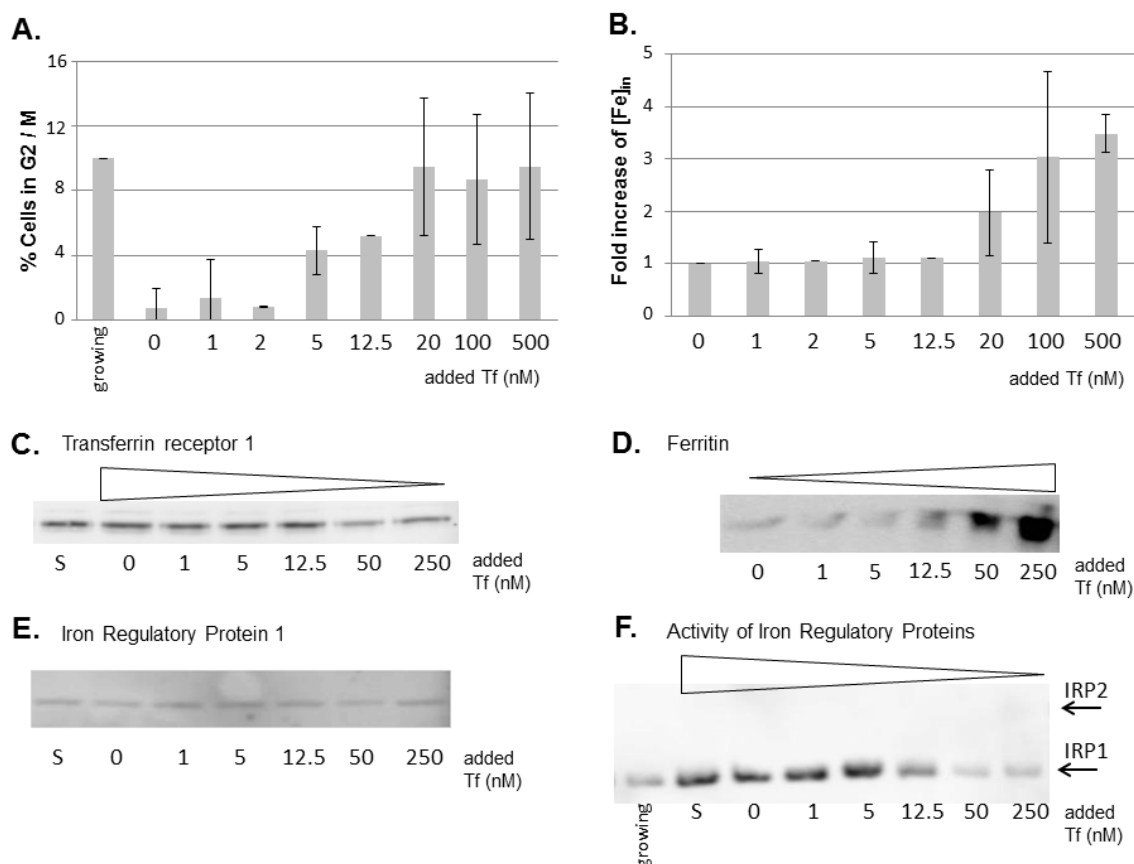


Figure II-3. Recovery of iron-depleted K562 cells after addition of holo-transferrin.

(A) re-entry in the cell cycle after 24h of replenishment with iron-loaded Tf (Tf), as measured in different experiments (N = 3) by integration of the G2/M peak. (B) Fold increase of the iron amount associated with the cells (N = 3). The average amount of Fe is 60 pmol/10⁶ K562 cells in the absence of Tf (Tf=0). (C-E) Western blots of one representative experiment showing Tf receptor 1, ferritin, and IRP1, respectively, as a function of added Tf to iron depleted cells. S is the sample taken at the end of iron depletion, *i.e.* 24 h before the other iron-rescued samples. (F) RNA electrophoretic mobility shift assay of lysates from iron replenished cells with the indicated Tf concentrations in the same experiment. The positions of the shifted bands corresponding to recombinant IRP1 and IRP2 (see Fig. S2) in this assay are indicated on the right side. Triangles are included to indicate the direction of significant changes, but they do not imply monotonous variations.

Thus the behavior of the cell lines upon iron recovery may quantitatively vary since growth of KG1 or HeLa cells resumed at smaller Tf concentrations than K562 cells. But the Tf concentration range rescuing growth arrest and death triggered by iron depletion and inducing re-entry into the cell cycle falls within a few tens of nM of Tf, at most, for all examined cell lines.

2.4.3 Molecular changes associated with iron replenishment

The iron concentration associated with cells followed the amount of added holo-Tf (**Fig. II-2; Fig. II-3B**). Yet, a consistent shift of the Tf concentration at which iron started to accumulate was observed (**Fig. II-2; Fig. II-3A,B**) compared to the concentrations triggering growth resumption, as monitored by increases in cell density and the development of the proportion of cells in the G2/M phase for instance. This indicates that iron storage occurs only when basic cellular needs are secured, including those required for proliferation in the present experimental conditions.

Ferritin is the protein responsible for intracellular iron storage. Immuno-detection of ferritin was found to follow the increase of intra-cellular iron as expected (**Fig. II-3B,D**). In a mirroring function, the Tf receptor is all the more needed as iron is lacking. It thus decreased as more iron became available (**Fig. II-3C**). Ferritin and Tf receptor 1 clearly increased and decreased, respectively, at lower Tf concentrations in KG1 cells (**Fig. II-S2**) than in K562 cells (**Fig. II-3**).

The Iron Regulatory Proteins (IRP) were identified three decades ago as major regulators of ferritin and Tf receptor 1 translation (*Leibold and Munro, 1988; Rouault et al., 1988*). According to its accepted mechanism, active IRP in iron limited conditions are repressors of ferritin translation and enhancers of Tf receptor 1 synthesis. In line with the results of the immuno-blots for ferritin and the Tf receptor 1, the IRP activity, but not the amount of the IRP1 protein, decreased as iron became available to cells via Tf (**Fig. II-3, Fig. II-S2**). Changes in the concentration of other iron regulated proteins, such as NDRG1 (**Fig. II-S3**), were also observed in these experiments, which indicates that the implemented conditions

largely dealt with iron/Tf effects rather than with less direct mechanisms. Indeed, lipid peroxidation, inducible heme oxygenase (HO-1), or oxidizing species concentrations did not significantly change in any of the samples (**Table II-S1 and Fig. II-S1**). Thus, the behavior of the studied cell lines cannot be explained by, or be associated with, iron mobilization by increased oxidative stress and cellular damage.

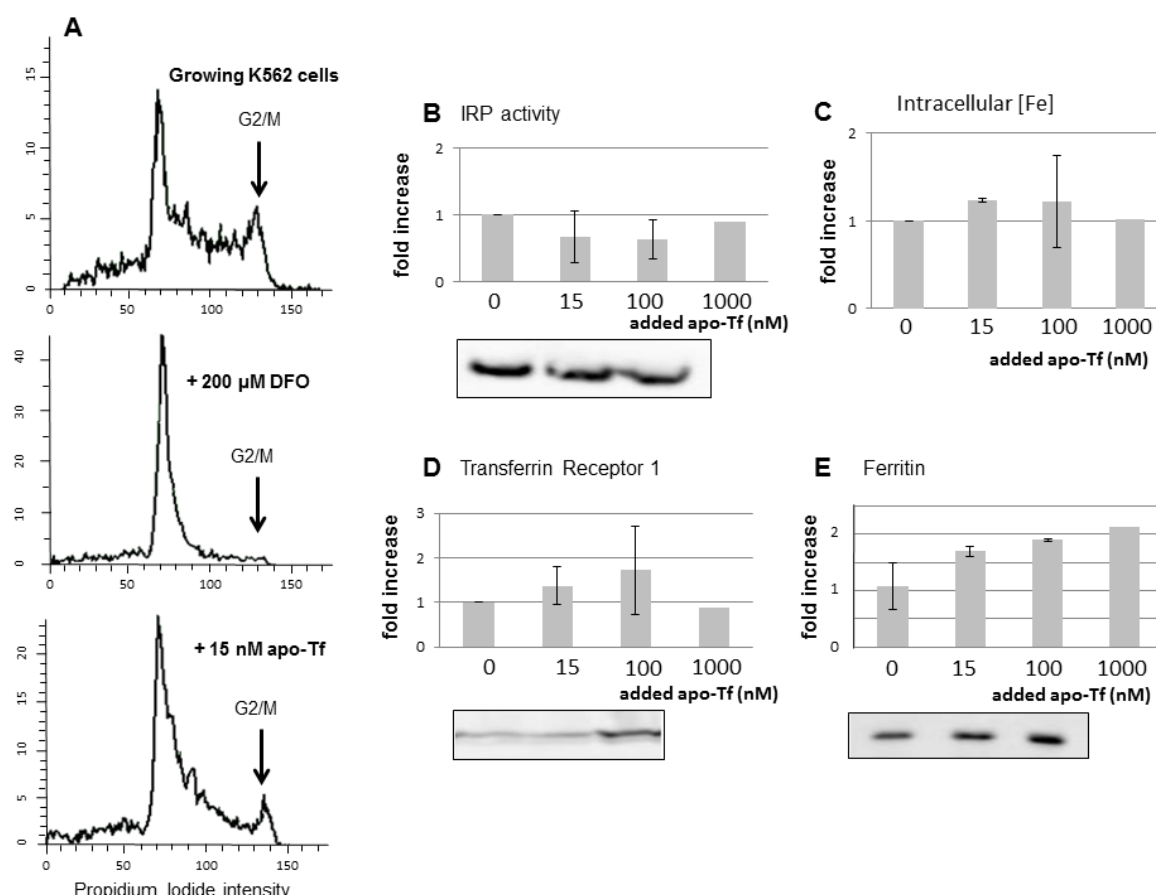


Figure II-4. Evolution of iron-depleted K562 cells after addition of apo-transferrin.

(A) Cell cycle analysis of K562 cells, top: under standard (iron replete) conditions; middle: after iron removal by 200 μM DFO for 24h; bottom: after adding 15 nM apo-Tf for 24 h to DFO-treated K562 cells. (B) IRP activity as a function of added apo-Tf. The histogram of shifted IRP-Iron Responsive Element bands is the cumulative data in which the intensity of these bands is related to the amount of IRP protein determined by Western blot and set to 1 for Tf=0. The shifted bands of a representative experiment are shown below the relevant Tf values. (C) Iron associated with iron-depleted K562 cells after adding the indicated concentrations of apo-Tf for 24 h. The average amount of Fe is 90 pmol/10⁶ K562 cells without iron addition (ApoTf=0). (D) Tf receptor 1 and (E) Ferritin Western blots and cumulative amounts of the proteins relative to β-actin in different experiments.

Apo-Tf can maintain viable iron-depleted cells for a short time (**Fig. II-4A**) whereas cells without apo-Tf did not show any sign of growth (absence of G2/M cells for instance). However, addition of apo-Tf did not significantly change the IRP activity (**Fig. II-4B**), the amount of the Tf receptor 1 (**Fig. II-4D**), and only marginally ferritin (**Fig. II-4E**). Also, the iron associated with cells did not dose-dependently follow added apo-Tf (**Fig. II-4C**). Thus, whereas apo-Tf avoided immediate death of iron-depleted K562 cells, it did not display the dose dependency observed with holo-Tf (**Fig. II-3**).

2.4.4 Derivation of the iron concentration needed for cellular growth

The data reported in **Fig. II-3** and **Fig. II-S2** call for a quantitative assessment of the species under consideration. Toward this aim, it is convenient to use a previously developed theoretical framework (*Mobilia et al., 2012b*) (and unpublished). The regulatory effect of iron on the IRP was represented by a sigmoid of the form $[\text{Fe}]^n / ([\text{Fe}]^n + \theta^n)$, where $[\text{Fe}]$ is the iron concentration detected by the regulatory system, θ is a value representing the iron threshold triggering the IRP activity (increasing below, disappearing above), and n is a number indicating the steepness of the sigmoid. Using this iron-dependency and assuming regulation by $[\text{Fe}]$ has reached a stationary state at the time of the measurement, the variations of the IRP activity with $[\text{Fe}]$ were adjusted according to:

$$\text{IRP}/\text{IRP}_{\text{max}} = ([\text{Fe}]^n + \theta^n) / ((h+1)[\text{Fe}]^n + \theta^n) \quad (1)$$

Derivation of this equation is presented in Appendix 1. IRP_{max} is the IRP activity measured without added Tf and considered to be maximal, and h is the ratio of the kinetic constants for the disappearance of IRP activity (the one in the presence of abundant iron divided by that in its absence). In the case of K562 cells the best adjustment of the data equating $[\text{Fe}]$ in **Eq. 1** to the provided Tf bound iron returned values of $\theta = 61.3$ (SD 15.4) nM, $h = 3.95$ (SD 0.7), and $n \sim 2$ (**Fig. II-5**). It means that the iron concentration modifying the IRP activity is that afforded by ca. 30 nM of added fully loaded Tf, and that the rate of disappearance of the IRP activity is 4-fold faster in the presence of iron than in its absence. A similar treatment of the

data obtained with KG1 cells returned values close to 10 nM and 4 for θ and h , respectively (*Fig. II-5*).

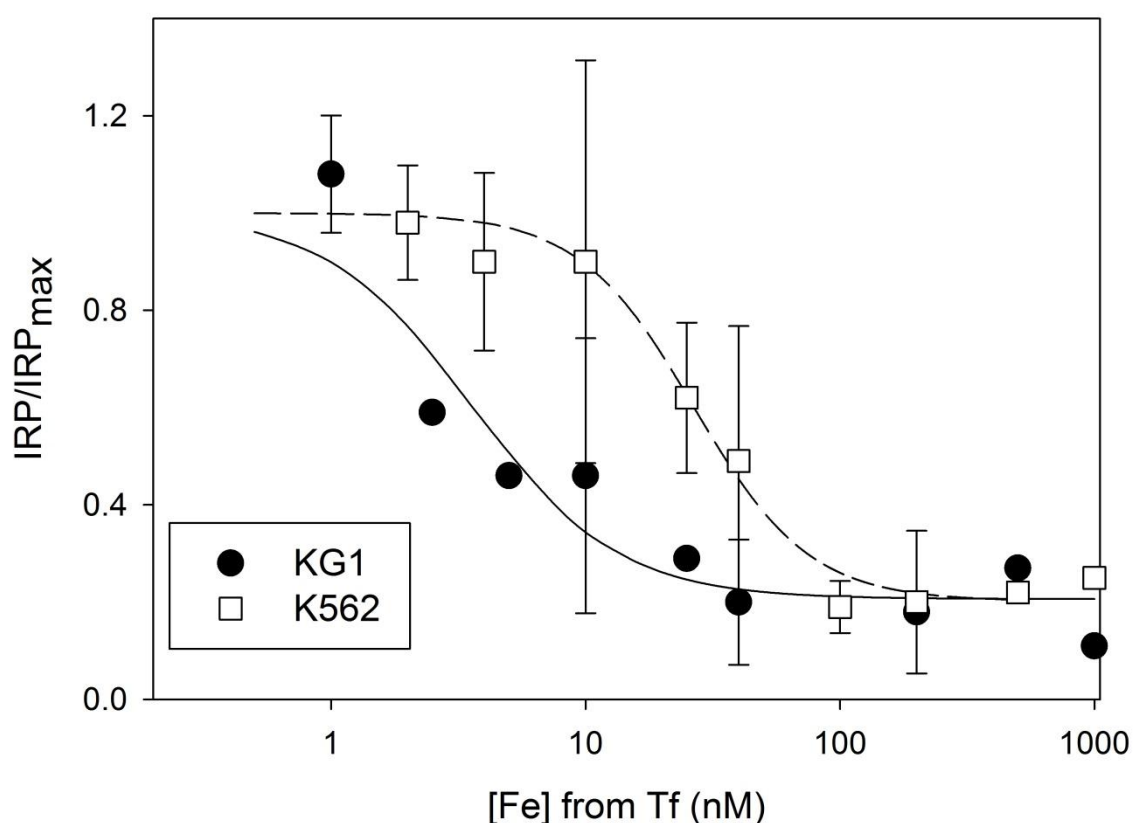


Figure II-5. Iron Regulatory Proteins sensitivity to iron-bound transferrin.

The IRP activity at any given concentration of added Tf was plotted relative to that without Tf, and the drawn lines were adjusted to the experimental data with the analytical expression and the parameters reported in the text. Cumulative data from 3 different experiments for each cell line were used for this analysis, but the points without standard deviation bars were not present in all experiments.

The values of h and n are similar in both cell lines (see also **Table II-S2**): this suggests that the mechanisms involved in regulating the IRP activity are conserved in different cells. The calculated values of θ deserve further analysis, because the correspondence between the added Tf-bound iron and the intracellular concentration detected by IRP is not

straightforward. **Fig. II-3** shows that cell-associated iron started to increase at externally added Tf values higher than those triggering the decrease of IRP activity and the increase of the number of cells re-engaged in the cycle. This strongly suggests that all provided iron in the lowest Tf concentration range is readily used for biosynthetic needs without storage. Further, for a given cell type, a single set of parameters accounts for the sigmoidal dependence of IRP/IRP_{max} with $[Fe]$ (**Fig. II-5**). Thus, the amount of externally provided iron and the “IRP-detected” intracellular one are simply related and assumed to be proportional. But, since it is difficult to estimate the value of the proportionality coefficient from the data or from theoretical considerations, we let intracellular $[Fe]$ of Eq. 1 vary between 1/100 and 100-fold the external Tf-bound iron concentration in adjustments similar to those of **Fig. II-5**. Satisfactory fits for the K562 data were obtained, in which h and n did not change, and the boundaries for θ were approximated (**Table II-S2**). If the intracellular iron concentration detected by IRP were 100-fold that provided by Tf, cells would concentrate 100-fold externally available iron, all into the intracellular fraction detected by IRP only, before the onset of storage. This situation seems very unlikely, as it implies that ferritin is used for far higher intracellular iron concentrations than 100-times that of externally provided Tf, *i.e.* in the μM range in our experiments. It thus seems more realistic to limit this multiplicative factor to values way lower than 100. Of note, growth resumption of progenitors from cord blood (see below) and of both KG1 and HeLa cells occurred at lower Tf concentrations than for K562 cells, indicating even lower iron needs in these cases. From this analysis it may be concluded that the concentration of intracellular, easily mobilized, and Tf-derived iron most probably falls well below a few hundred nM to support cellular division.

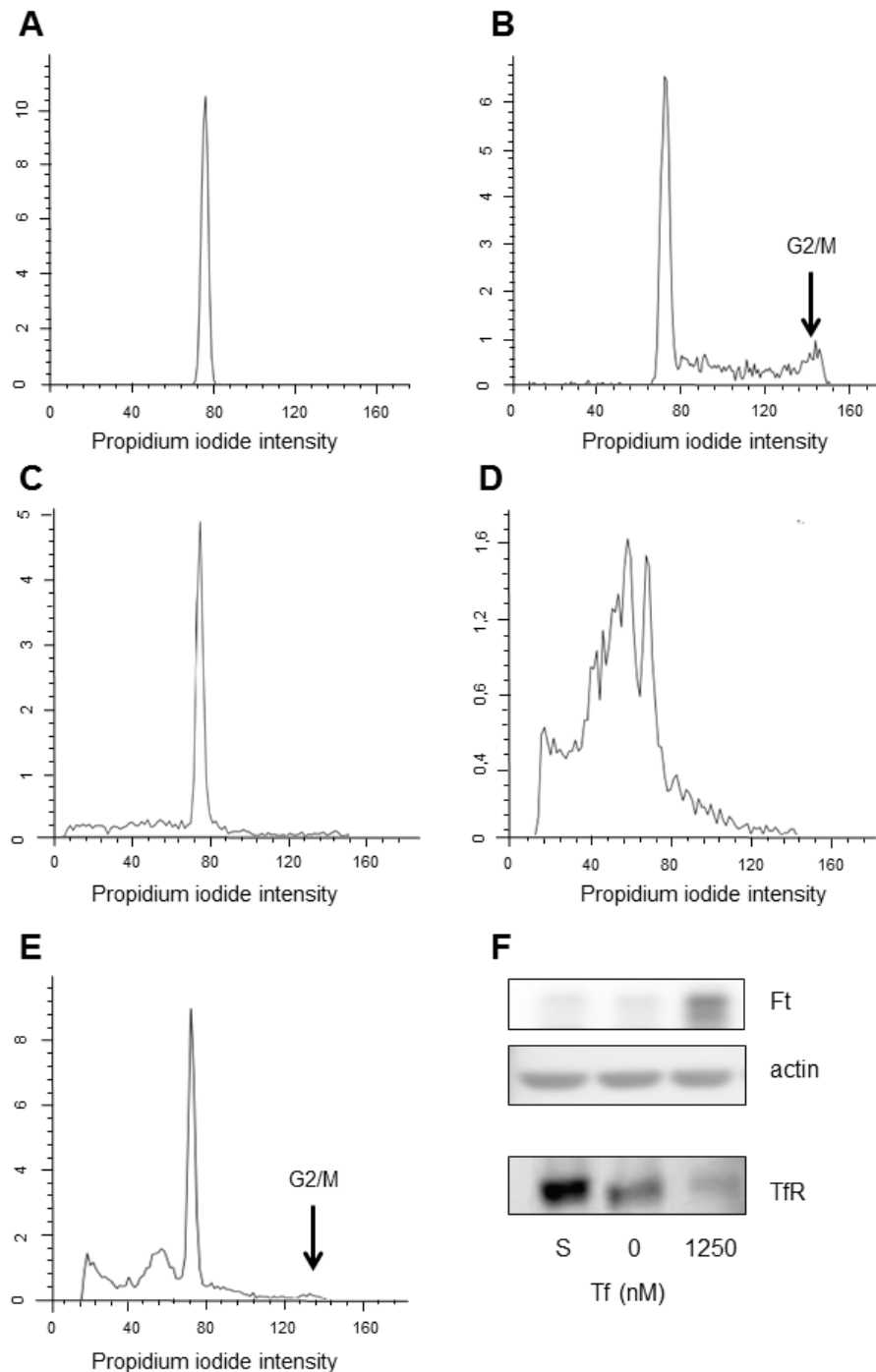


Figure II-6. Amplification of primary CD34⁺ cells.

Cell cycle analysis of CD34⁺ cells (A) after isolation, (B) after 3 days of amplification in the complete medium, (C) as in (B) and an additional day in the presence of 200 μ M DFO, (D) as in (C) and an additional day in the complete medium without Tf, (E) as in (C) and an additional day in the complete medium with 15nM Tf. (F) Isolated CD34⁺ cells were amplified for 3 days, treated with 200 μ M DFO for 24h (S), and kept for an additional day in the minimal synthetic medium supplemented with 1.25 μ M Tf or not (0). The indicated proteins were detected by immuno-blotting.

2.4.5 Transferrin dependence for amplification of CD34⁺ progenitors

CD34⁺ progenitors were isolated from cord blood and the influence of Tf-bound iron on growth was studied for comparison with cell lines. The purification procedure gave preparations with more than 80% (mean 89.2% SD 5.3 for 13 experiments) of quiescent CD34⁺ cells (**Fig. II-6A**).

To circumvent the uncertainties in the composition of the complex media supporting culture of CD34⁺ cells, a minimal medium of well-defined composition (see section 2.5) was designed following the pioneering work of others (*Murray et al., 1999*). The purified progenitors proliferated in the medium containing ca. 1 μ M holo-Tf, with up to a 4-fold increase of CD34⁺ cells after 3 days. Accordingly, the proportion of cells in the G2/M phase meanwhile rose (**Fig. II-6B**) from 0 after isolation to up to 8%. Amplified cells could be kept for up to 9 days in culture, even with nM concentrations of Tf, and with medium changes every 3 days. Omission of Tf rapidly led to cell death without amplification or differentiation. Expansion of CD34⁺ cells was accompanied by the increase of the cell-associated iron concentration above 200-250 nM of added Tf, but not below.

Treatment of amplified CD34⁺ cells with up to 200 μ M DFO for 24 h stopped growth (**Fig. II-6C**), and removal of the chelator without Tf addition did not maintain viable cells (**Fig. II-6D**). Thus, DFO-treated CD34⁺ cells are deficient in readily available iron. But addition of holo-Tf concentrations as low as 5 nM maintained viable CD34⁺ cells and growth resumed, as shown in **Fig. II-6E** at 15 nM. The ferritin protein also increased with large iron provision, with a mirroring decay of Tf receptor 1 (**Fig. II-6F**), as observed with cell lines (**Fig. II-3, Fig. II-S2**). In experiments in which small concentrations of either holo-Tf (e.g. **Fig. II-6E**) or apo-Tf (e.g. **Fig. II-4A**) were added to the growth medium of progenitors, viability stayed at the same level with both forms of Tf for a short time (< 2 days). Efforts to deplete serum albumin of bound cations (see section 2.4) left 300 nM of iron on average (SD=75, 7 independent measurements) in the complete minimal growth medium. Therefore, ca. 10 times more iron than provided by holo-Tf is present in the growth medium, and any form of Tf (apo- or

recycling holo-) is needed to make a little part of non-Tf bound iron available to the cells. Yet, amplification of CD34⁺ cells increased with added holo-Tf, indicating that iron associated with Tf turnover was the limiting factor for progression of the cell cycle. Congruent with the observations made with cell lines (**Fig. II-3; Fig. II-4; Fig. II-S2**), it can be concluded that CD34⁺ progenitors enter the cell cycle and start proliferating with less than 15 nM Tf, a concentration similar to that supporting growth of KG1 and HeLa cells after DFO chelation.

2.5 Discussion

The present studies provide an unprecedented opportunity to estimate the amount of iron needed to support growth of hematopoietic progenitors and of different cell lines after sufficient depletion for growth arrest. A key feature of these experiments is that no external compound, such as a fluorescent probe, was added to secure readouts. Instead, a set of iron-sensitive endogenous parameters were measured to monitor levels of functional cellular iron. Accordingly, cellular stores were monitored by ferritin levels, and the amount of iron needed to reinitiate growth was precisely measured by quantitatively following the iron trafficking proteins, such as Tf receptor 1, and the activity of the cellular iron regulatory system (Iron Regulatory Proteins). The remaining iron traces in the different conditions have been taken into account by demonstrating the mandatory addition of iron-loaded Tf for proportional growth, and by showing the very limited ability of apo-Tf to mobilize residual non-Tf bound iron.

2.5.1 Significance of Functional intra-cellular Iron Concentration (FIC)

The estimate of the iron amount needed to support cellular growth (**Fig. II-3, II-5, II-S2**) is significantly smaller than previous phenomenological measurements of exchangeable iron by fluorescent probes *e.g.* (*Kakhlon and Cabantchik, 2002; Petrat et al., 2002*). In a situation as complex as that afforded by cellular iron homeostasis, it is difficult to exactly know which iron species are detected by fluorescent molecules (*Carter et al., 2014*). In contrast, the present experiments only monitor endogenous systems. Hence, the two approaches certainly have

their own merits and they should be used accordingly. To acknowledge this difference, and considering the largely accepted term of *labile iron pool* (LIP) coined to the metal that can be bound by fluorescent reporter-molecules, we propose to designate by *functional iron concentration* (FIC) that detected by the endogenous iron-responsive systems, mobilized for viability, and estimated here. Increases of the LIP have often been proposed to participate to increased oxidative stress via intracellular Fenton-like chemistry, whereas the FIC identified herein does not generate any sign of oxidative imbalance (**Table II-S1**).

The lower values of FIC as compared to LIP brings the available intracellular iron concentration closer to those of other essential transition metals, including zinc which is generally found in total amounts similar to those of iron in biological systems. Indeed, despite the relatively large quantities of zinc present in cells ($> \mu\text{M}$), the cytosolic concentration of the Zn^{2+} ions is buffered largely below nM values (Maret, 2011). In the case of iron the θ values of the FIC fall below the dissociation constants measured for most iron-containing enzymes and proteins (Hider and Kong, 2013a). Without entering into a thorough discussion of this point, it is of note that the only iron chaperones postulated in mammalian cells belong to the poly(rC) binding proteins (PCBP) family (Leidgens et al., 2013). The lowest dissociation constant describing the binding of the first iron atom to PCBP1 is below $1 \mu\text{M}$ (Shi et al., 2008), and the transfer of that iron to ferritin, the first proposed substrate of iron loaded PCBP1/2, displays thermodynamic constants in the $0.2\text{-}0.3 \mu\text{M}$ range. These data perfectly fit in the scenario emerging from our studies: the determined FIC is relevant under iron-limiting conditions, before the involvement of PCBP and the need for storage in ferritin. Thus, the idea of a FIC adds a missing link in mammalian cellular iron homeostasis by depicting the available iron readily delivered by Tf for immediate cellular needs, *i.e.* below the iron concentrations demanding storage.

2.5.2 Consequences for normal and pathological hematopoiesis, and other conditions

The observations and quantitative evaluations made with the K562 and KG1 cell lines also apply to the primary cells they can be considered to derive from. Amplification of the CD34⁺ cord blood progenitors was efficient in minimal medium (**Fig. II-6B**) with small, in the nM range, concentrations of Tf. The low FIC values are of relevance in pathological situations. For instance, myelodysplastic syndrome (MDS) patients often need regular transfusions to reach a suitable circulating hemoglobin concentration. However, this treatment is prone to induce iron overload and a majority of these patients benefit from iron chelation therapy in terms of overall survival (*Lyons et al., 2014*) and dependence on transfusion. Acute myeloid leukemia (AML) as cause of death in non-refractory anemia with ring sideroblasts MDS patients was annihilated by iron chelation in a retrospective clinical analysis (*Leitch et al., 2012*). Hence, the AML clones likely grew on the ample iron provision afforded by transfusions, and the continuing presence of chelator counteracted this effect. Iron manipulation to oppose growth of cancer cells should thus integrate the presently determined concentrations as target values to optimize efficiency while minimizing risks. Another example is the widespread provision of erythropoietic stimulating agents (ESA) in cancer related, radiation- or chemotherapy-induced, anemia. Patients suffering from cancer related anemia with low Tf saturation and medium/low ferritin may be offered a combination of ESA and intravenous iron under various forms (dextran, sucrose, gluconate, etc.) in a relatively short period of time (*Gilreath et al., 2014*). Increased hemoglobin levels and decreased needs for transfusions are efficiently reached in clinical studies (*Gilreath et al., 2014*), often with increase of the Tf saturation (and of circulating ferritin) in responding patients with very low (<20%) values before enrollment. But the still incomplete evaluation of intravenous iron injections, particularly in the long run, is requested (*Gilreath et al., 2014*).

2.6 Conclusions

The requirement for proper iron monitoring, especially in a clinical context, is called for by our studies, which show that even low Tf concentrations and small iron loads, at low nM levels, promote growth of transformed cells. Such cells may remain after or during chemotherapy, hence increasing the risk of relapse with sustained iron provision. Iron chelation (*Hider and Kong, 2013b*) and iron deprivation with drug delivery by targeting Tf receptor 1 (*Daniels et al., 2012*) afford high hopes in anti-cancer therapies. With the presently reported information at hand, this promising field should focus on the differences between iron homeostasis in normal and pathological cells (*Torti and Torti, 2013*) in order to allow design of more targeted and efficient treatments.

2.7 Acknowledgments

Cécile Cottet-Rousselle and David Laurin are thanked for their valuable help with the flow cytometry instrument belonging to the LBFA technical facility and purification of hematopoietic progenitors, respectively.

This work was supported by grants from *Région Rhône-Alpes* (Programme Cible 2010), *Institut Rhône-Alpin des systèmes complexes (IXXI)*, *Université Joseph Fourier Grenoble* (Programme Agir 2013), *Direction de la Recherche Clinique (DRC) CHU Grenoble*, and Novartis. The company played no role in the design and the interpretation of the results. EP is the recipient of a grant from the *Société Française d'Hématologie (SFH)*.

2.8 Appendix

The temporal evolution of active IRP has been previously described (*Mobilia et al., 2012a*) and it has the following form:

$$\frac{dy}{dt} = k_1 - k \cdot \sigma \cdot y - k_2 \cdot y$$

where y is the variable representing the concentration of active IRP, k_1 , k , and k_2 are the kinetic constants for non-regulated production, iron-dependent inactivation, and non-regulated degradation of IRP, respectively. σ is a sigmoid function of available iron ($[Fe]$) and of the iron threshold (θ) regulating the IRP activity according to:

$$\sigma = [Fe]^n / ([Fe]^n + \theta^n)$$

in which n represents the steepness of the iron regulation of IRP. Under conditions of extreme iron shortage, as implemented after iron chelation and growth arrest with onset of cell death, $\sigma \sim 0$, and, assuming that the IRP activity has reached a stationary state ($dy/dt = 0$), $y = y_{\max} = k_1/k_2$

After 24 h of iron replenishment, it is assumed that cells have reached a density dependent on the externally provided iron (bound to transferrin). This density does not increase further and it corresponds to a steady state. This assumption appears valid for small transferrin concentrations, since proliferation is not supported beyond this time limit and cell death starts in the absence of further iron addition. At higher iron concentrations it is less correct as growth continues for a number of divisions which parallels iron provision. The steady state assumption ($dy / dt = 0$) implies:

$$\frac{y}{y_{\max}} = \frac{k_1}{k\sigma + k_2} \times \frac{k_2}{k_1} = \frac{k_2}{k\sigma + k_2} = \frac{1}{\left(\frac{k\sigma}{k_2} + 1\right)}$$

writing $h = k/k_2$ and developing:

$$\frac{y}{y_{\max}} = \frac{[Fe]^n + \theta^n}{h[Fe]^n + [Fe]^n + \theta^n} = \frac{[Fe]^n + \theta^n}{(h + 1)[Fe]^n + \theta^n}$$

which is Eq. 1 used in Fig. 5.

2.9 Supplementary material

Table II-S1 Levels of oxidizing species estimated with fluorescent probes.

Cells were treated as indicated in 2.4 and loaded with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA). The fluorescence of DCF was measured to compare cells before and after treatment with the deferoxamine iron-chelator.

Cell line	Number of experiments	Fold increase of DCF fluorescence after chelation	
		Mean	Standard Deviation
KG1	5	1.2	0.8
K562	6	0.7	0.5

Chapitre 2: Concentration fonctionnelle en fer

Table II-S2 Parameters calculated from the IRP activities as analyzed with equations derived in Appendix.

K562			
[Tf] multiplier	0.01	1	100
n (SE)	1.9209 (0.3699)	1.9209 (0.3699)	1.9209 (0.3699)
θ (SE)	5.5767 (1.6329)	61.3096 (15.3799)	674.0351 (460.3015)
h (SE)	3.9487 (0.6994)	3.9487 (0.6994)	3.9487 (0.6994)
KG1			
[Tf] multiplier	0.01	1	100
n (SE)	1.5107 (0.5778)	1.5107 (0.5778)	1.5107 (0.5778)
θ (SE)	0.4823 (0.3615)	10.1666 (6.3565)	214.2966 (367.3108)
h (SE)	3.8436 (1.2742)	3.8436 (1.2742)	3.8436 (1.2742)

Data were plotted according to the $IRP/IRP_{max} = f([Fe])$ function indicated in the text. The best adjustments of the experimental data were sought by iteration from different series of starting parameters values (n, θ, h) using SigmaPlot v.11 (Systat Software, Inc.). The results were insensitive to these initial values over wide ranges. The calculated parameters are given with their standard errors (SE). The unit for θ is nM, n and h are dimensionless.

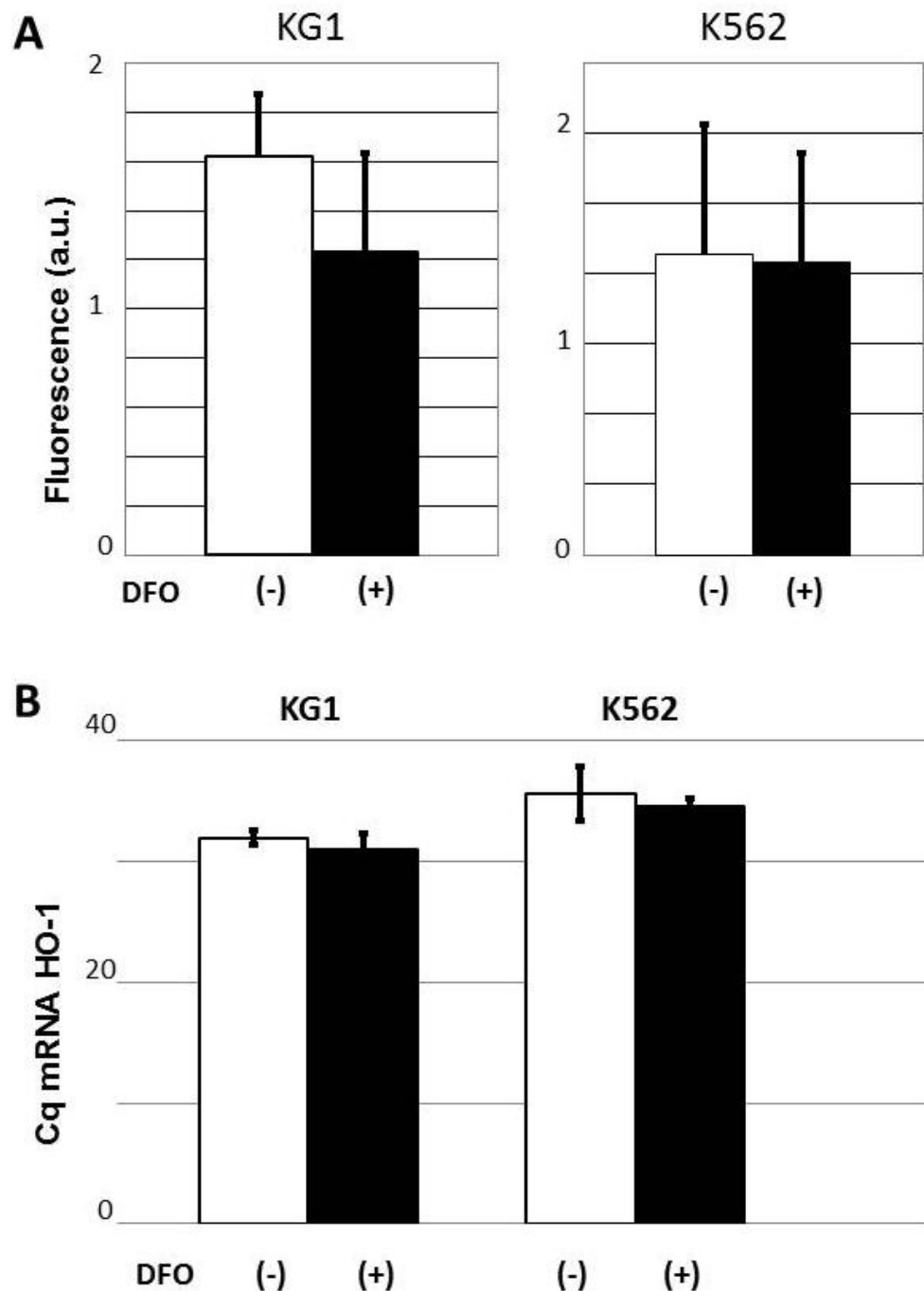


Figure II-S1. Effect of iron-depletion on lipid peroxidation and on expression of inducible heme oxygenase (HMOX1).

(A) Fluorescence (a.u.: arbitrary units) of thiobarbituric acid reactive species is plotted for proliferating (white bars) and DFO-treated (black bars) KG1 (left) and K562 (right) cells. Data from 3 independent experiments. (B) The histograms show the averaged C_q of HMOX1 with standard deviations for 4 and 5 independent determinations with KG1 and K562 cells, respectively.

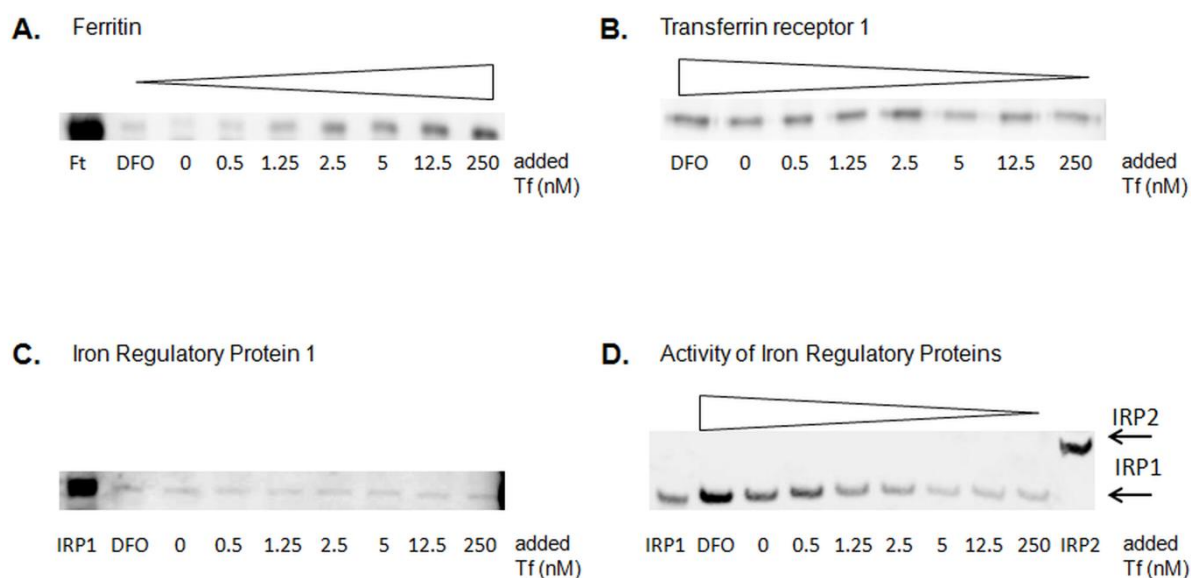


Figure II-S2. Recovery of iron-depleted KG1 cells with holo-transferrin.

(A-C) Representative Western blots of ferritin, transferrin receptor 1, and IRP1, respectively, as a function of added Tf to iron depleted cells. (D) RNA electrophoretic mobility shift assay of lysates from iron replenished cells with the indicated Tf concentrations. Recombinant human IRP1 and IRP2 were included in this assay for reference. Other conditions were similar to those of Fig 3. DFO is a sample taken just after DFO chelation, i.e. at the start of the replenishment experiment.

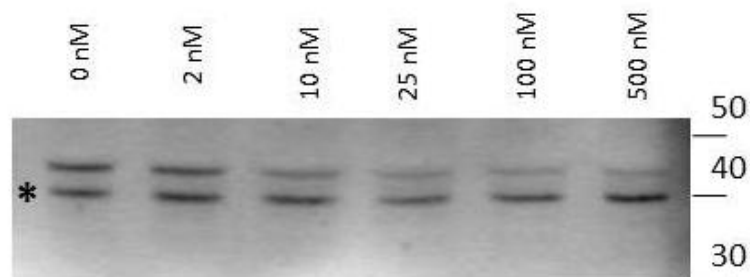


Figure II-S3. NDRG1 variations upon holo-transferrin rescue from the iron-depleted state.

Starting from iron-depleted K562 cells for 24h with 200 μ M DFO, transferrin bound iron was added in the minimal medium (see 2.4) at the indicated concentrations. The disappearance of the NDRG1 protein was followed by immuno-blotting with the anti-human NDRG1 goat polyclonal antibody (Abcam ab37897). The asterisk indicates a non-specific band, and M_r ($\times 10^{-3}$) are indicated on the right side.

*Chapitre III : Description du
système régulateur IRE-IRP dans les
progéniteurs leucémiques de patients
atteints de leucémie aigüe myéloïde*

1. CONTEXTE

Description du système régulateur IRE-IRP dans les progéniteurs leucémiques de patients atteints de leucémie aigüe myéloïde

1.1 La modulation du fer dans les leucémies aiguës myéloïdes impacte le destin cellulaire

Dans les LAM, que ce soit avec les principaux chélateurs du fer connus (*Callens et al., 2010*) ou avec de nouvelles molécules présentant une capacité chélatrice (*Roth et al., 2012*), il a été observé un arrêt de la prolifération avec une augmentation de l'apoptose, et un engagement des blastes leucémiques dans la lignée monocyttaire (augmentation des marqueurs CD11b et CD14) lors de la privation en fer des cellules blastiques sanguines. Ces observations ont été obtenues à partir de culture *in vitro* de lignées cellulaires et de cellules primaires de différents sous types de LAM, et confirmées par un essai *in vivo* sur un patient (*Callens et al., 2010*). Cette carence induite s'accompagne d'une augmentation du niveau d'ERO et de l'activation des voies MAPK (Mitogen-activated protein kinases). Bien qu'il y ait actuellement un regain d'intérêt pour le traitement par déplétion en fer, principalement en raison de l'amélioration des propriétés pharmacologiques des nouveaux chélateurs, les premiers essais ne sont pas récents. En 1987, Estrov et al. utilisèrent la déferoxamine pour traiter *in vitro* et *in vivo* des blastes indifférenciés exprimant des marqueurs de la lignées lymphocytes B d'un enfant porteur d'une leucémie aiguë. La transformation de l'expression des marqueurs de surface d'un profil lymphoïde à un profil myélomonocyttaire fut déjà observé (*Cazzola et al., 1990*). Les résultats furent similaires sur des lignées leucémiques telles que HL-60 (cellules myéloblastiques), U-937 (cellules monoblastiques) ou NB4 (cellules promyélocytaire) (*Callens et al., 2010; Cazzola et al., 1990; Kaplinsky et al., 1987*). Cependant, récemment fut observé que l'ajout de *Vitamin D* (VD) au traitement chélateur semble en potentialiser l'effet (*Callens et al., 2010*). Une étude rétrospective a récemment démontré l'effet potentiel de l'association chélateur (dans ce cas le déferasirox) et vitamine D sur l'amélioration de la survie des patients âgés dans la LAM (*Paubelle et al., 2013*). La VD en se liant à son récepteur forme un complexe agissant sur les Vitamine D Responsive Elements au niveau des régions promotrices de nombreux gènes. La VD est ainsi un agent de différenciation, notamment orientant vers la lignée monocyttaire, mais dont l'utilisation en thérapeutique a été limitée en raison de l'hypercalcémie

Chapitre 3: Le système IRE-IRP des blastes de patients LAM

secondaire induite. Son action sur l'activation des MAPK (JNK, ERK et p38) et la modulation de l'expression de 30 gènes communs marque une similitude avec l'action observée lors du traitement par chélateur du fer. Ceci démontre que les chélateurs peuvent agir sur la voie de signalisation du récepteur à la vitamine D, sans que les mécanismes ne soient totalement élucidés à ce jour. La déplétion en fer par chélateur et la vitamine D, seuls ou associés, possèdent donc une capacité pro-différenciante et antiproliférative sur les blastes leucémiques. Ce traitement, qui n'induit cependant pas une rémission complète, pourrait avoir son intérêt chez les patients réfractaires aux chimiothérapies, âgés ou en rechutes. Son bénéfice sur la réduction des rechutes ou le ralentissement de la progression de l'hémopathie lors d'une utilisation précoce après découverte de la LAM reste à démontrer.

Si nos données précédentes montrent que progéniteurs sains et progéniteurs leucémiques requièrent un apport de fer minimum identique pour maintenir leur intégrité, les preuves d'un besoin accru en fer par les cellules leucémiques restent indirectes (*Cazzola et al., 1990*). En effet, cela s'appuie sur l'existence d'un taux de récepteur de la transferrine augmenté favorisant le flux d'entrée du métal, et un haut niveau d'expression de la ribonucléotide réductase (RR) qui témoigne d'un engagement dans le cycle cellulaire. Le système régulateur IRE-IRP devrait selon toute vraisemblance voir son activité adaptée à ce contexte. D'autres situations pourraient potentiellement être rencontrées, comme observé dans l'érythropoïèse normale en phase terminale de différenciation (*Schranzhofer et al., 2006*), où l'homéostasie du fer échappe au système IRE-IRP dans un processus qui n'est plus dépendant du flux de fer. Le système régulateur IRE-IRP n'a toutefois jamais été étudié dans les cellules leucémiques myéloïdes, ni comparé aux cellules primaires non pathologiques. Les particularités observées sur les lignées leucémiques, modèle de cette hémopathie, nécessitent d'être vérifiées sur des cellules primaires issues de patients, avec les limites que constituent la disponibilité des échantillons biologiques et l'absence de milieu de culture *in vitro* adapté (sans apport de sérum animal) permettant une modulation des ressources en fer.

1.2 L'effet bénéfique de la modulation du fer dans une autre forme d'hémopathie maligne, les syndromes myélodysplasiques.

L'exemple de l'impact de la surcharge en fer dans les syndromes myélodysplasiques (MDS) est particulièrement évocateur du lien entre homéostasie du fer, production d'ERO et hémopathies malignes. Les MDS se caractérisant également par un défaut d'hématopoïèse efficace, ils peuvent évoluer en leucémie aiguë. La surcharge en fer chez les patients polytransfusés induit une augmentation du stress oxydant participant très probablement à l'émergence du clone myélodysplasique et au déficit de l'hématopoïèse normale. La suspicion de la contribution de l'accumulation du fer à la physiopathologie des MDS, notamment par l'accroissement du stress oxydant (*Hartmann et al., 2013; Taoka et al., 2012*), et sa potentielle implication dans l'accélération vers la transformation en leucémie aiguë a conduit à la mise en place d'essais cliniques utilisant des chélateurs comme dans les traitements des MDS sur le long terme afin d'évaluer l'amélioration de la survie. L'impact bénéfique des chélateurs du fer et de la réduction concomitante des espèces oxydantes sur ces patients confirme ce rôle, même si les mécanismes de cette action thérapeutique sont encore incomplètement élucidés, avec notamment des différences constatées sur l'évolution des ERO entre expérimentations *in vitro* et essais *in vivo* (*Ghoti et al., 2010*). En effet, les études *in vitro* dans les MDS ont montré une réduction de la prolifération et de la viabilité des progéniteurs myélodysplasiques après traitement par déferasirox, accompagné d'une augmentation des ERO (*Pullarkat et al., 2012*).

2. ARTICLE EN PREPARATION

Description of the IRE-IRP central node in AML: impact of iron regulation on proliferation and differentiation of leukemic progenitors.

In preparation

Emmanuel Pourcelot^{a,b,c,e}, Marine Lénon^{a,b}, Jean-Yves Cahn^{c,f}, Jean -Marc Moulis^{a,b,d}, Pascal Mossuz^{c,e}

^aUniversité Grenoble Alpes, Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics, and Environmental and Systems Biology, Grenoble, France

^bInserm, U1055, Grenoble, France

^cUniversité Grenoble Alpes, TIMC-Imag CNRS 5525, Grenoble – France

^dCommissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives-Institut de Recherches en Technologies et Sciences du Vivant, Grenoble – France

^eCHU Grenoble, Laboratoire d'Hématologie, Institut de Biologie et Pathologie, Hôpital Albert Michallon Grenoble – France

^fCHU Grenoble, Clinique d'hématologie, Hôpital Albert Michallon, Grenoble – France

List of Abbreviations

aconitase 2 (ACO2); 5-aminolevulinic acid synthase 2 (ALAS2); Acute myeloid leukemia (AML); bone marrow (BM); cord blood (CB); divalent metal transporter 1 (DMT1), erythropoietin (Epo); erythropoietin receptor (EpoR); French-American-British (FAB); Ferritin (Ft); ferroportin 1a (FPN1a); FMS like tyrosine kinase 3 (Flt3); $\alpha/\beta/\gamma$ -globine ($\alpha/\beta/\gamma$ GLO); hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (hPRT); hypoxia inducible factor 2 α (HIF2 α); hypoxia inducible lipid droplet-associated (HILPDA); inducible heme oxygenase (HO-1); iron regulatory proteins (IRP); labile iron pool (LIP); myelodysplastic syndroms (MDS); reactive oxygen species (ROS); peripheral blood mononuclear cell (PBMC); reverse transcriptase- quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR); ribonucleotide reductase (RR); transferrin (Tf); transferrin receptor 1 (TfR1); stem cell factor (SCF); thrombopoietin (TPO); western blot (WB).

2.1 Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) are characterized by the uncontrolled proliferation of immature cells, the blasts. Clinical evidence of a link between iron availability, redox signaling, and malignancy has been previously provided. In hematopoiesis, a finely tuned coordination of iron handling conditions results in a balance between cell growth, death, and differentiation. Thus, deregulation of iron management may play a role in the fate of leukemic cells, as suggested with iron chelation therapy attempts, which stop blast growth and commit them in the monocytic lineage.

Yet, the iron requirements of leukemic clones, detrimental to differentiation, remains ill-characterized. The central node of intracellular iron regulation, represented by the IRE-IRP systems has been studied in blast cells from AML patients and compared to immature CD34+ cells of healthy donors to get insight into a possible modification of iron modulation in pathological hematopoiesis.

In this preliminary retrospective study, activity of IRE-IRP system has been measured for 8 AML patients and 3 other leukemic patients. In agreement with our previous data on cell line models, IRP1 is exclusively responsible for this activity, with large variations between patients. But this activity is always above that measured for healthy controls. Description of the profiles of the IRE targets argues for a globally conserved pattern between healthy and leukemic cells. Significant IRP1 protein degradation was also observed in the AML cells.

Altogether, these results are in line with our previous data on leukemic model cell lines, and they suggest that blasts modulate their IRP response to fulfil their shifted iron needs compared to healthy cells.

2.2 Introduction

Cellular regulators constitute central nodes of complex networks which interact together and influence one other. Among these networks, regulation of iron homeostasis is involved in cell proliferation and differentiation, as well in normal than in malignant haematopoiesis (*Tothova et al., 2007*).

Iron is an essential element for cell growth. Cancer cells require iron in larger amounts than other cells types as they proliferate more rapidly. They usually rely on large iron provision by transferrin receptor 1 (TfR1), including as a prosthetic center of ribonucleotide reductase (RR), a key enzyme for the S phase of the cell cycle. Thus, iron depletion stops cell growth and leads to cell death by apoptosis. Also, iron deprivation modulates cyclins A, E and D with the involvement of kinases, CDK2 and CDK4, and CDK inhibitors such as p16INK4, p21WAF1 / CIP1 or p27KIP1 (*Nurtjahja-Tjendraputra et al., 2007; Pourcelot et al., 2013*).

Iron is also a major cause of cellular stress by the capacity of ferrous iron to reduce hydrogen peroxide into highly reactive hydroxyl radicals (Fenton reaction) (*Puntarulo, 2005*). As a result, deregulations of the management of iron by the cells are directly linked to increase of reactive oxygen species (ROS) levels, activation of redox-responsive signaling pathways, and signs of oxidative stress (*Hole et al., 2011; Ito et al., 2004*). This is certainly related to the role of iron in the differentiation and proliferation of leukemic cells. The example of the impact of iron overload in myelodysplastic syndromes (MDS) is particularly evocative of this link between iron homeostasis, ROS production and hematologic malignancies. Iron overload in patients receiving multiple transfusions induces an increase of oxidative stress most likely involved in the emergence of myelodysplastic clone, with impaired normal hematopoiesis. The beneficial impact of iron chelators and the concomitant reduction of oxidative species in these patients confirm this role. In AML, it was also observed a blockade of the proliferation of blast cells with an increased apoptosis, and a commitment in the monocytic lineage after iron deprivation and treatment with vitamin D (*Callens et al., 2010; Roth et al., 2012*).

Chapitre 3: Le système IRE-IRP des blastes de patients LAM

Interestingly, this effect is related to changes in ROS production, as modulated by the use of antioxidants.

Cellular iron homeostasis heavily relies on a ubiquitous regulatory system acting at the translational level. It involves two components, the Iron Regulatory Proteins (IRP), and the Iron Responsive Element (IRE), specific sequences located in the non-coding regions of the regulated mRNAs (*Wang and Pantopoulos, 2011*). Some targeted mRNAs such as those of the ferritin subunits (FTL/FTH1), ferroportin (FPN1), or transferrin receptor-1 (TfR1) are directly associated with iron management, whereas others are not, which emphasizes the close connection between iron regulation and other pathways of cellular metabolism. In a pathological context, such IRE-mRNA as hypoxia inducible factor 2 α (HIF2 α) suggest a potential impact of iron regulation networks in leukemia proliferation by the control of hypoxia. Furthermore, IRP display an ambiguous role in tumorigenesis, since IRP2 can increase growth of tumour xenografts in mice (*Maffettone et al., 2010*), whereas over expression of IRP1 can inhibit it (*Chen et al., 2007*). Iron scavenging used in short term iron chelation therapy can reduce parameters of oxidative stress.

Thus, it appears that a finely tuned coordination of iron handling conditions contributes to decide on the balance between cell growth, death, and differentiation which plays a critical role in the fate of normal hematopoietic stem cells and of leukemic ones. However to get insight into the iron dependence of pathological hematopoiesis, the metabolic and regulatory molecular networks, that are sensitive to iron, need to be characterized.

In this context, we have analysed leukemic progenitor cells of AML patients for the molecular status of the main components of the IRE-IRP-dependent network. Conservation of a part of the IRE-IRP regulatory systems between healthy and malignant cells was demonstrate and a possible alteration of IRP regulation was highlighted in primary leukemic cells.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Biological materials

Healthy hematopoietic progenitors cells

CD34⁺ progenitors cells used as control of normal hematopoiesis come from cord blood unit after isolation by ficoll-hypaque (Abcys - Eurobio) density gradient, and then separated using immunomagnetic cell sorting (Miltenyi Biotec). Cord blood procedures were approved by the French Blood Service's Institutional Review Board, and samples were obtained from healthy donors who gave informed consent. In proteins analysis, a pooled CD34⁺ cord blood cells provide by Stemcell Technologies (Vancouver, Canada) was also used. A second types of CD34⁺ progenitors cells were used as control. Provide by Allcells (California, USA), these bone marrow cells come from a unique healthy donor, an 42 years old white women.

Leukemic progenitors cells

Leukemic progenitors were obtained from patients at diagnosis of acute myeloid leukemia, that is to say before therapeutic treatment adjunction. Cytological analysis, immunophenotyping, genetic and molecular biology analysis (Flt3 and NPM1 mutations) were performed from medullar samples for the diagnosis. Remnants of medullar samples were treated by ficoll-hypaque density gradient to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Then PBMC were stored in 10% DMSO in liquid nitrogen. Experimental analysis was realized after thawing of these complementary samples. Written informed consents were obtained for each patients. Selection of AML samples used in this work were based on medullar blasts percentage (minimum 60%) and on CD34 percentage. Non myeloid leukemia such as AML five, six or seven of the French-American-British classification were excluded. Specific myeloid leukemia represented by promyelocytic leukemia (AML 3 from FAB classification) was also excluded.

2.3.2 Culture and media

CD34⁺ were grown in a synthetic minimal medium where iron supply could be controlled. This media was composed of Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Life Technologies), 1% iron-depleted albumin (as described above), 200 µg/mL insulin, 0.1 mM β-mercaptoethanol and the StemMACS HSC expansion cocktail (TPO/FLT3/SCF - Miltenyi Biotec) at 37°C in 5% CO₂. Freshly isolated CD34⁺ cells were seeded at 1 x 10⁵ cells/mL and cultured for amplification three days in the above minimal medium supplemented with 1.25 µM holo-Tf. Viable cells were determined by Trypan blue staining in Neubauer slides.

2.3.3 IRP activity measurement

IRP1 and IRP2 RNA-binding activities were measured by electrophoretic mobility shift assays with 3 µg of total protein extracts. The minimal sequence of human ferritin H-chain Iron Responsive Element (IRE) was biotin-labeled with biotinylated cytidine (bis)phosphate using T4 RNA ligase (Thermo Scientific). The IRE-IRP reaction was carried out as previously described (*Brazzolotto et al., 1999; Dycke et al., 2007*) and the complexes were separated on non-denaturing 4% PAGE in 0.5X TBE, transferred onto HybondTM N+ membrane (GE Healthcare) and the biotinylated bands were detected after interaction with the streptavidin-horseradish peroxidase conjugate by the chemiluminescent luminol product. Quantitation of the signals was done with the Image J software (v1.47, Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). For reference, recombinant human Iron Regulatory Proteins 1 and 2 were obtained as previously detailed (*Brazzolotto et al., 1999; Dycke et al., 2007*).

2.3.4 Western blotting

Thirty µg of total proteins were resolved by polyacrylamide gel electrophoresis on 8-16% gradient gel (Gentaur GeBaGel or BioRad MiniProtean TGX). Then proteins were transferred

to polyvinylidene difluoride membranes using tris-glycine-20%EtOH liquid transfer buffer. The blots were saturated with 10% non-fat milk in PBS-Tween 0.2% and probed overnight at 4°C with antibodies (all produced in rabbit) against IRP1 (1:500) (*Martelli and Moulis, 2004*), ferritin (1:1000, Cell Signaling Technology), transferrin receptor 1 (1:1000, Abcam), and actin (1:250, Sigma Aldrich). Following three washes with PBS-Tween 0.2%, the blots were incubated with horseradish peroxidase-coupled goat anti-rabbit IgG (Bethyl Laboratories) at a dilution of 1:5000 for 1h at room temperature, followed by detection with the Pierce ECL western blotting substrate (Thermo Scientific). Recombinant human Iron Regulatory Proteins 1 & 2 (IRP1r / IRP2r) and human placenta ferritin (Sigma) was used to control signal specificity. Quantitation of the signals was done with the Image J software (v1.47, Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA).

2.3.5 RT-qPCR reaction

Total RNA was purified using High pure RNA isolation kit (Roche). Complementary DNA was synthesized from 0.5 to 1 µg of RNA with modified Moloney Murine Leukemia virus reverse transcriptase (M-MuLV RT, Euromedex) and oligo(dT)12-18 primer. After dilution 1/30 of the product of the RT reaction, the cDNA was amplified by real time PCR on a MX3000P instrument (Stratagene), using validated primers (Pourcelot et al, in preparation, chapter I) and the HOT Pol Evagreen qPCR Mix Plus (Euromedex). The reference genes were hPRT, 36B4 and GAPDH. Statistical comparative analysis of qPCR results was made with the REST 384 freeware (beta version 2, 2006, Technical University Munich/Qiagen).

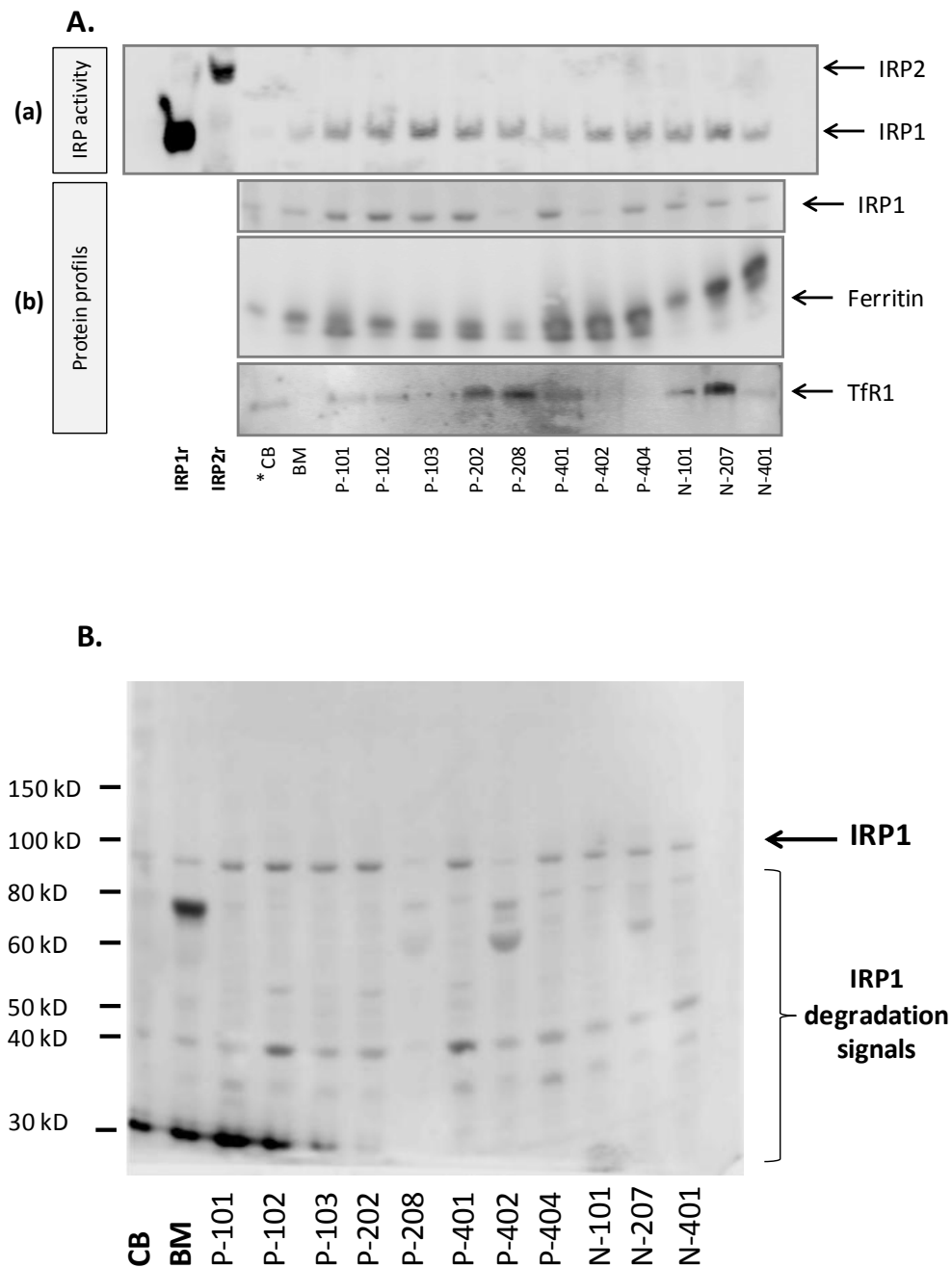


Figure III-1. Identification of the key components of the IRE-IRP regulatory systems.

A. IRP activity was studied by **(a)** RNA electrophoretic mobility shift assay of lysates from healthy cord blood (CB) and bone marrow (BM) progenitors, and from eleven leukemic primary cells. "P-xxx" are CD34 positive blasts and "N-xxx" are CD34 negative blasts. The positions of bands corresponding to recombinant IRP1 and IRP2 in this assay are indicated on the right side. Asterisk shows samples for which a total protein account of 3µg could not be used (the normalization was made at the signal integration). Qualitative analysis of the two major proteins regulated by the IRP systems was studied by **(b)** ferritin and transferrin receptor western blot for each AML.

B. The western blot of the IRP1 protein made on the same sample as described in A, shows, for each sample studied, an important degradation of the protein theoretically detected at 93kD. Major products of degradation are identified at 30 and 40kD.

2.4 Results

2.4.1 Status of the IRE-IRP system in leukemic cells

The activity of the IRPs was measured in cells of eleven acute myeloid leukemia patients with blast counts above 60% (mean 76% ; SD 12.7) in bone marrow (**Table III-S1**) : eight of them had counts with the CD34 cell surface marker in more than 60% of the sample (mean 80.4% ; SD 11.5) and three in which the percentage of CD34 was below 40% (mean 13% ; SD 20.8). These 3 samples with a low CD34 phenotype are more engaged in the differentiation process than the highly CD34 positive ones. In the following, the samples will be designated P for those with CD34 labelling above 60% of the cells, and N for those below 40%, followed by the type (1,2, or 4) of the AML in the French-American-British classification and the number of the patient. For instance, P101 refers to the first patient with AML1 and 96 % of CD34 cells.

The IRP activity in the leukemic cells was measured by RNA electrophoretic mobility shift assays and it was compared with that found in healthy CD34⁺ cells of bone marrow (BM control). **Figure III-1Aa** shows a shifted band of higher intensity for the AML samples as compared to the healthy control. A second healthy control from pooled CD34⁺ cord blood cells (CB control) gave similar results, with the IRP activity similar to that BM control. Of note, in all samples, the IRP2 activity was not detected in agreement with previous data showing that this protein is not significantly present in undifferentiated hematopoietic cells (Pourcelot et al., in preparation, chapter I) (*Pourcelot et al., 2015*). In all AML samples the IRP1 activity increase between 150% and 480% compared to BM and CB healthy controls (**Fig. III-2A, light grey bars**).

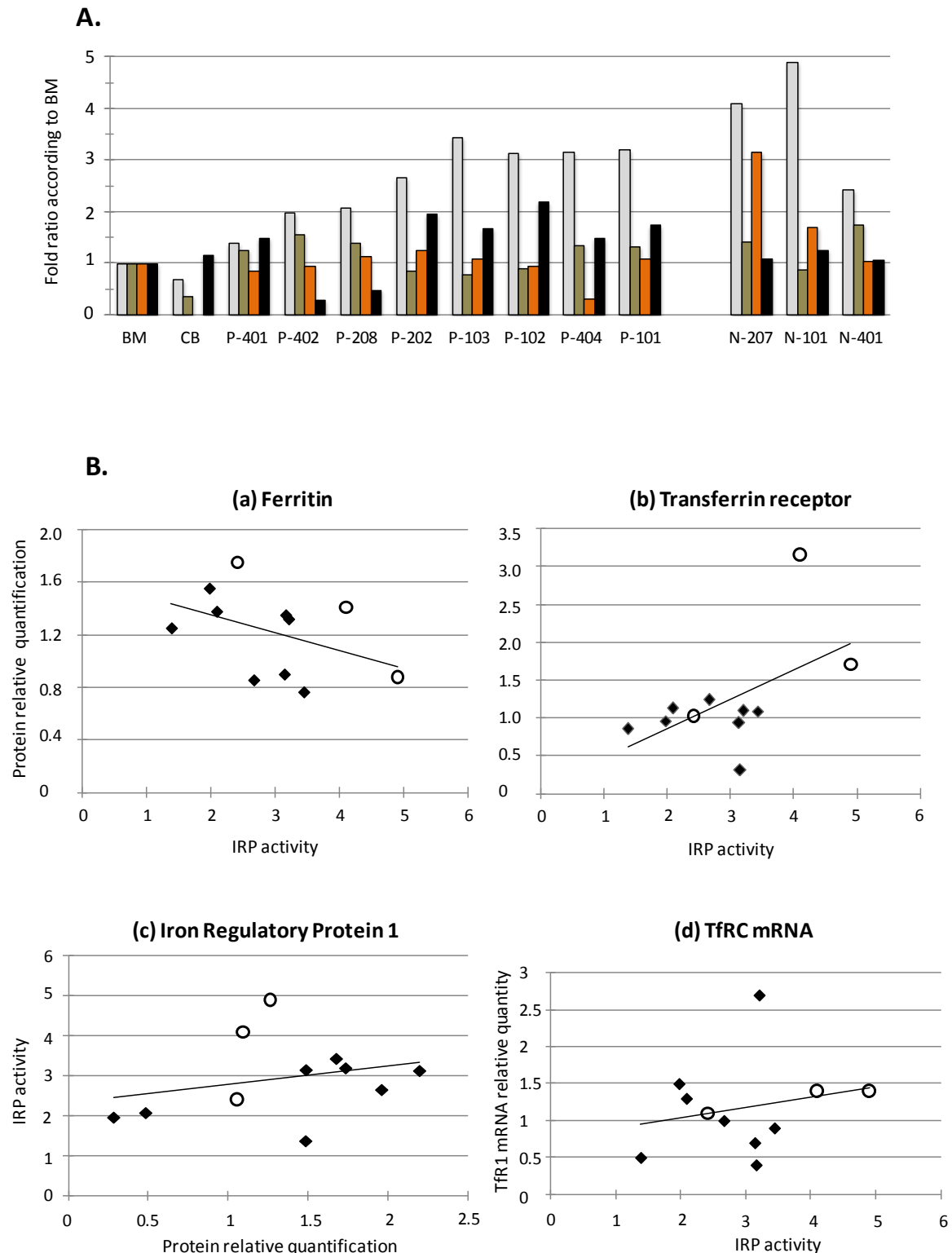


Figure III-2. Behavior of IRP systems in AML patients.

A. Histogram of the previous REMSA and western blot signals standardized per actin or total protein concentration, and relative to the bone marrow control signal. For each AML patients, first light grey bar correspond to the IRP activity, the brown bar to the ferritin protein, the orange bar correspond to the transferrin receptor protein, and the last black bar to the total IRP1 protein.

Chapitre 3: Le système IRE-IRP des blastes de patients LAM

B. Representation of the correlation trend for the set of patients studied for **(a)** ferritin concentration and **(b)** transferrin receptor according to IRP activity, and for **(c)** IRP activity according to the total IRP1 protein concentration, (d) the relative quantity of TfRC mRNA according to IRP activity which is theoretically responsible of mRNA stabilization due to 3'IRE position. (♦) are patients CD34+ and (o) are patients CD34-. Results described in this figure are the cumulating data of two independently treated frozen samples coming from the same patient sample at the diagnosis.

The strongest IRP1 activities were observed for the two N-207 and N-101 CD34⁻ AML samples. These blast cells are CD13⁺, which indicates commitment into the monocytic lineage.

Of note, although the IRP1 activity was easily detected, the IRP1 protein signal at the expected molecular weight (98 kDa) was not the only one detected by immuno-blotting. Indeed, several bands reacting with the polyclonal IRP1 antibody were seen below 80 kD (**Fig. III-1B**). The main fragments occurred at ca. 30, 40 and 75kD, and they were assigned to the major degradation products of IRP1. Degradation was also observed for BM and CB controls, with a strong degradation product at 80 kD for the BM control and another one at 30kD for both samples. AML patients P101 and P102 also show a strong IRP1 degradation at 30kD. So, all the samples present a different relative quantity about IRP1 degradation products. In our previous work with hematopoietic cell lines (*Pourcelot et al., 2015*), signs of IRP1 degradation were not observed even though similar experimental procedures were implemented. Despite the degradation of the IRP1 protein, the IRP activity was correlated with the full size IRP1 protein (**Fig. III-2B c**).

To evaluate the IRP-regulated Ft and TfR1 proteins, they were quantified by Western blot in blast of AML patients and they were organized according to the IRP activity ranking (**Fig. III-1A b , Fig. III-2A**). When the ferritin levels were normalized to the actin intensity, the amounts found in AML samples varied by a factor of 2 at most, and they were similar to the levels measured in control samples. However, the ratio between heavy (H) and light (L) chains displayed large variations between patients, with predominant H chain in some samples, and approximately equivalent H and L amounts in others.

The bone marrow and cord blood controls, as well as the CD34⁻ samples, had all a larger amount of H than L-chain in ferritin, whereas most CD 34⁺ samples had higher L-chain proportions, with the only exception of P102.

As expected from the repression exerted by IRP on its targets with 5' IRE, the increase of IRP activity corresponded to a decrease of ferritin (**Fig. III-2B a**). The differences between extreme values were approximately 2-fold. Opposite to ferritin, IRP1 activity should stabilize the TfRC mRNA, and a positive correlation was found between TfR levels (mRNA or protein) and IRP1 activity (**Fig. III-2B b & c**). But, if the N-101 and N-207 CD34⁻ patients, and the P404 one are excluded from the series, a seemingly constant TfR1 level with different IRP1 activities appears (**Fig. III-2A**).

2.4.1 Transcriptional profiles of the iron network in Healthy and leukemic progenitors

To complete the description of iron handling by AML blasts, the relative expression of transcripts involved in iron homeostasis, was explored.

Overall, AML patients have qualitatively similar profiles (**Fig. III-3**) independent of the AML classification, and of the proportion of CD34-producing cells. In all patients, the ferritin mRNA are the most abundant, with those of the β -globin chain, among the studied genes. Noteworthy, the FTH1 mRNA concentration was larger than that of FTL in agreement with the relative amounts of the corresponding proteins (**Fig III-1A b**).

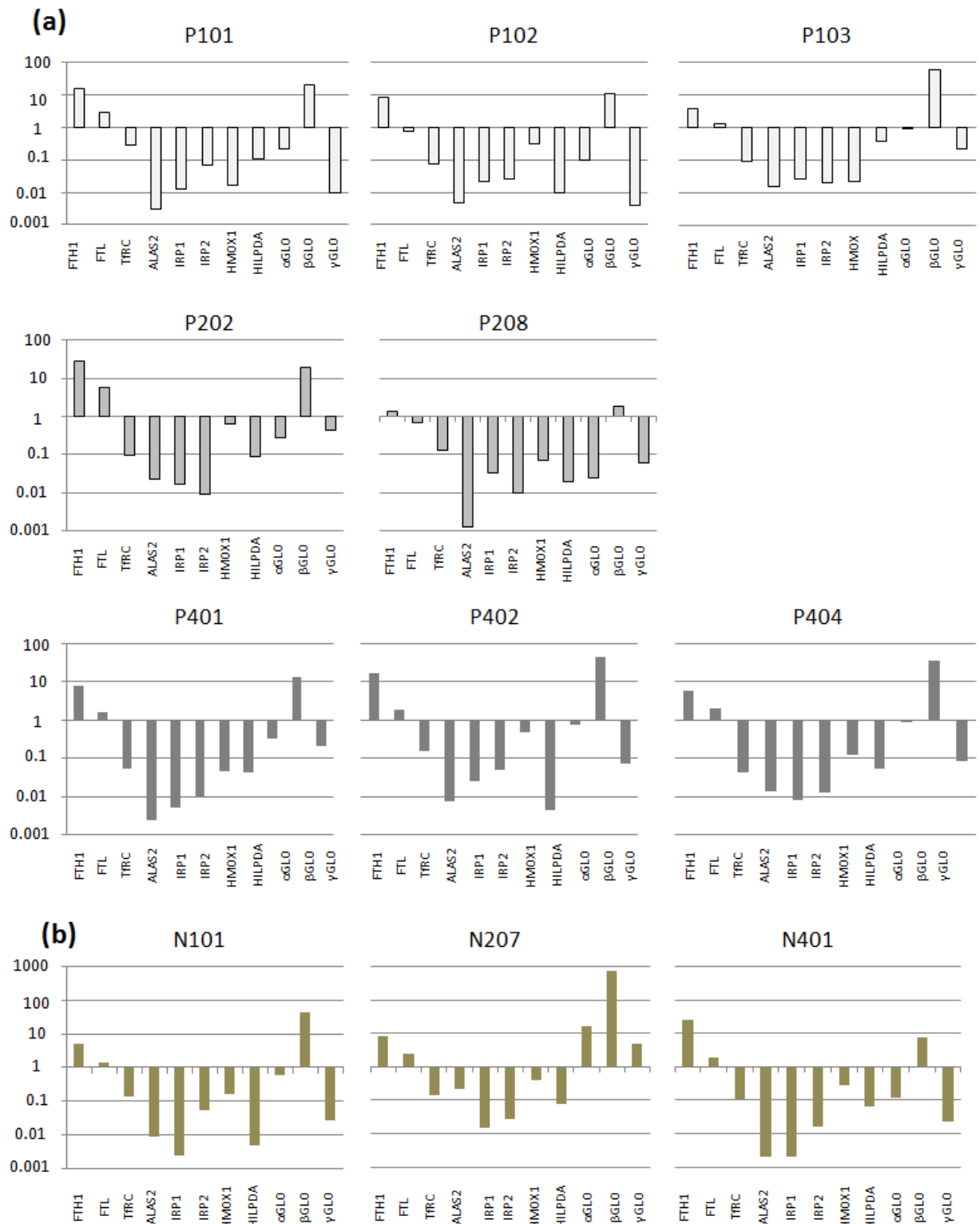


Figure III-3. Pattern of relative expression of several transcripts implied, directly or not, in iron network for patients with AML.

The expression is relative and normalized with hPRT, 36B4 and GAPDH reference genes. One profil = One patient. They have been grouped according to FAB AML classification: **(a)** AML patients CD34+, **(b)** AML patients CD34-.

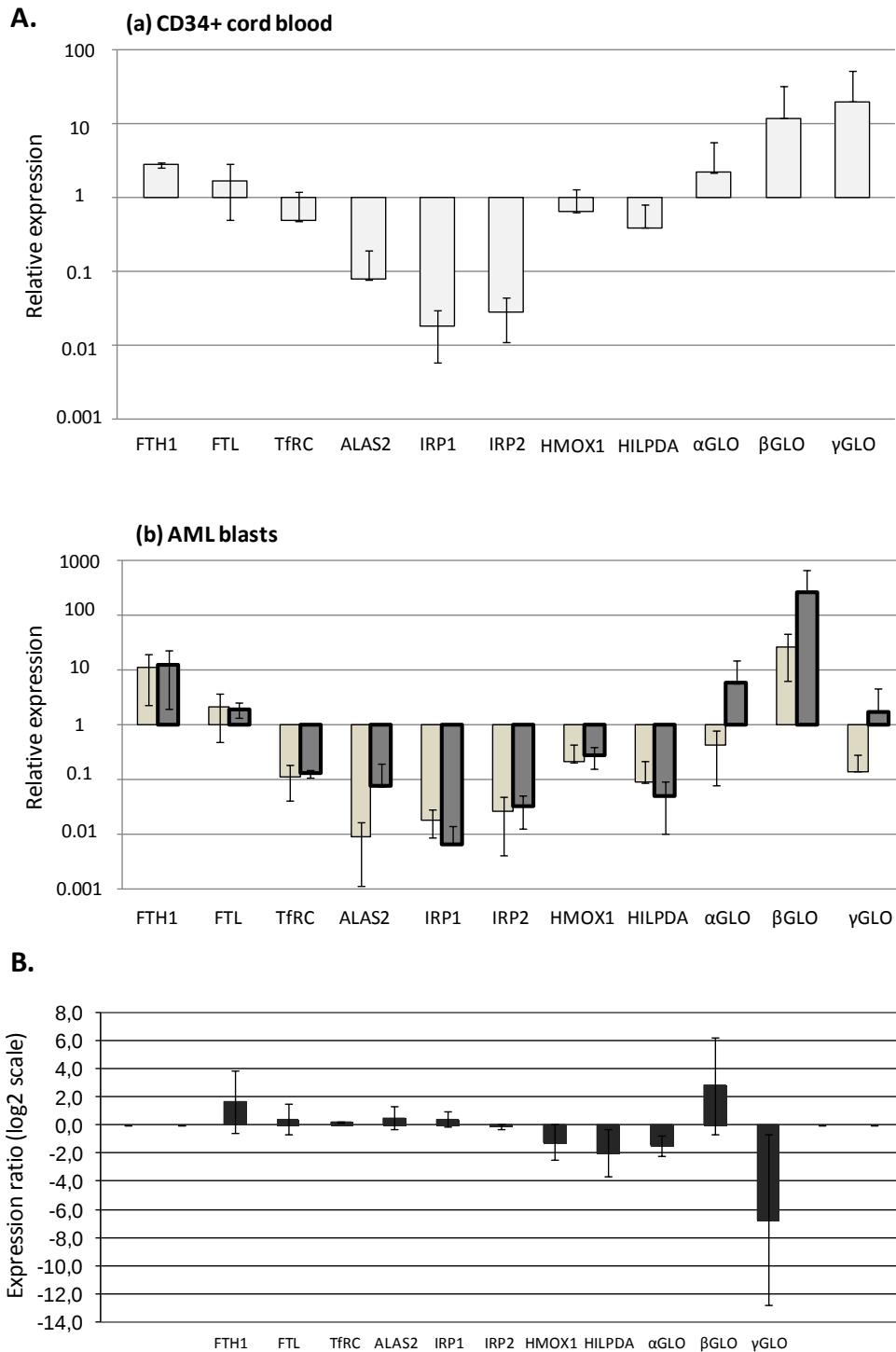


Figure III- 4. Comparison of the transcripts relative expression for the healthy cord blood progenitors and leukemic progenitors.

A. Histogram bars represent the mean of the cumulative transcripts relative expression (normalized with hPRT, 36B4 and GAPDH reference genes) for **(a)** CD34+ cord blood cells after cell sorting (quiescent cells ; n=4), and for **(b)** CD34+ (light grey bars; n=9) and CD34- (dark grey bars ; n=3) bone marrow blasts of acute myeloid leukemia.

Chapitre 3: Le système IRE-IRP des blastes de patients LAM

B. Differential of transcript relative expression for CD34+ acute myeloid leukemia cells compared to CD34+ cord blood cells. Statistical Significant difference was obtained for FTH1 ($p=0.041$), β GLO ($p=0.033$) and γ GLO ($p=0.001$).

ALAS2 and β -globin varied in parallel as anticipated by the coordinated regulation they experience (*Bekri et al., 2003; Sadlon et al., 1999*), including by IRP1 for the former (*Wingert et al., 2005*), among the different patients. Large variations of HMOX1, encoding inducible heme oxygenase 1 (HO-1), were observed, up to almost 2 orders of magnitude. This gene is involved in heme degradation and it is transcriptionally up-regulated by stress of oxidative origin in particular. It appeared significantly expressed in some AML samples (**Fig. III-4A b**). The HILPDA (hypoxia inducible lipid droplet-associated) gene, which is inducible by hypoxia, also largely varied in these cells, but without apparent relation to HMOX1.

Similar RT-qPCR experiments were carried out with CD34⁺ cells from cord blood ($n=4$). Qualitatively, the RNA profile (**Fig. III-4A a**) revealed a similar pattern of expression of the studied genes as in blast cells, except for the higher expression of γ -globin (foetal globin) in CB cells, as expected. The α -globin mRNA was also more abundant than in blast cells. Quantitatively, AML blasts expressed higher levels of FTH1 mRNA compared to cord blood progenitors, and lower levels of TfRC, ALAS2, and HILPDA. Comparative statistical analysis (**Fig. III-4B**) of the expression ratio from CD34⁺ cord blood cells to CD34⁺ leukemic cells showed significant differences between the transcription profiles of FTH1 subunit, which is up-regulated by a factor 3.17 between healthy CB and malignant AML progenitors ($p=0.041$). Differences were not significant for TfRC, ALAS2 and HILPDA. Among the other studied genes, significant differences were found for up-regulation of β -globin ($p=0.033$) by a factor 7, and down-regulation of γ -globin ($p=0.001$) by a factor 107.

The major differences between AML progenitors with the CD34 cell surface marker (supposedly the most immature ones) and CD34⁻ AML progenitors, were the higher expression of ALAS2 and of the three globin chains in the latter cells (**Fig. III-4Ab**). However this result is mainly due to the contribution of patient N207, as the other two (N101 and N401) displayed transcription profiles which were not significantly different from those of CD34 positive patients (**Fig. III-3 b**).

2.5 Discussion

A paradoxical feature of iron management in blast cells may be considered. On the one hand, high iron input of proliferating cells might increase of the labile iron pool (LIP) hence the ROS levels often associated with commitment into differentiation. On the other hand, differentiation is blocked, and iron depletion, concomitant with an decrease of LIP, favours differentiation with activation of MAPK and increase in ROS levels. Thus, we considered the possibility of specific iron management in blast cells. To this aim IRE-IRP central node of iron homeostasis in acute myeloid leukemia was studied with CD34 progenitors cells of AML and normal donors, obtained from cord blood or bone marrow for the latter.

2.5.1 A particular regulation of iron in primary leukemic cells of AML patients

Our previous experimental work has already characterized the IRE-IRP regulatory system in two leukemic cell line models (KG1 and K562) and in normal hematopoietic progenitors (Pourcelot et al., 2015) (Pourcelot et al., in preparation, chapter I). The experiments carried out here on leukemic cells from primary AML patients reveal a significant increase of IRP activity of at least 150% compared to CD34⁺ cells of healthy donors. The stronger activity of IRP in blast progenitors suggests that the leukemic cells sense lower iron availability relative to their needs in comparison to normal cells. The strongest IRP1 activity was observed in two CD34⁻ AML suggesting that IRP activity could be influenced by differences in maturation of blast cells.

Nevertheless, each sample obtained from patients showed degradation of the IRP1 protein. The processing of these samples was not significantly different from that implemented with cord blood progenitors for the iron depletion-repletion experiment in Pourcelot et al., 2015 (chapter II, data not shown), for which IRP1 signal was revealed without significant signal of protein degradation. However, it should be noticed the cord blood used in this later work were analysed after in vitro culture amplification, and not directly after cell sorting. A technical bias increasing degradation of the IRP1 protein of AML blasts appears unlikely, including because no degradation was observed for the other proteins detected by WB. Possibly, IRP1 is particularly sensitive to proteolysis in immature cells (leukemic and normal progenitors), but more experimental investigations are required to clarify this suggestion.

According to hypothesis of a disturbance of intracellular iron regulation, the weak variations of ferritin and transferrin receptor concentration across patients and compare to bone marrow sample, in relation to the strong variations of IRP activity, argue for ineffective regulation of mRNA translation by IRP. Effect observed on Ft and TfR1 are not proportional to the difference of IRP activity measured. Absence of IRP2 could be the reason of that deregulation because as considered with IRP2^{-/-} knock down mice model (Cooperman et al., 2005; Galy et al., 2005; LaVaute et al., 2001), residual IRP1 do not compensate for the loss of IRP2 in cells IRP2 depleted. To the opposite of this work, our previous studies of the IRE-IRP systems (Pourcelot et al., 2015) (Pourcelot et al., in preparation, chapter I) were conducted on cultured cells at 21% O² - 5% CO², condition in which Meyron-Holtz et al. show IRP1 compensate IRP2, explaining the effective regulation observed on Ft and TfR1 translation in spite of IRP2 absence. For reminder, here, patients cells from diagnosis day were analysed directly after isolation and freezing.

2.5.2 The targets of IRP system are quantitatively similar in normal hematopoietic progenitors and in AML CD34+ blasts

Another possibility for alteration of IRP regulation is re-modelling of the respective quantities of the IRP targets with possible changes of effective regulation priority. This is the reason justifying the establishment of mRNA profiles. The main characteristics shared by all progenitors are the very high levels of FTH1 and FTL transcripts, suggesting an important capacity of iron storage in these cells. Among patients, the most important quantitative variations were observed for ALAS2, HMOX1, HILPDA and globin chains, reflecting probably different levels of differentiation of leukemic cells due to not CD34 labelled remaining cells in the sample. The major differences between CD34+ AML (theoretically the most immature cells) and CD34- AML progenitors, were the overexpression of ALAS2 and the alpha and beta globin chains in the latter cells. This is consistent with CD34- blast cells being more engaged in cell lineages, with a fraction as early erythroïd progenitors expressing haemoglobin.

The transcript profiles of primary leukemic cells is quite similar to the transcript profile of cell line models previously studied (Pourcelot et al., in preparation, chapter I). Moreover, exploration of the same cellular components in CD34+ normal hematopoietic progenitors from cord blood, also revealed a similar transcript. As expected, ALAS2 and the γ -globin chain transcripts of cord blood are more engaged in the erythroïd lineage as evidence the differentiation assay on this cells (mentioned in chapter IV). However, the pattern observed for AML samples is similar to normal cells but with a higher IRP1 activity: this implies a less efficient regulatory effects of IRP1 in AML on its targets since the variations of the ferritin and TfR1 proteins remain modest.

2.6 Conclusion

In conclusion, our work draws a first picture of the central node IRP-IRE and its targets in leukemic cells from AML patients. Iron management by leukemic progenitors shares most of its general features with corresponding normal cells. However, this occurs with increased IRP1 activity, as well as increased FTH1 mRNA and H/L ferritin ratio of subunits. The relative inefficiency of IRP1 on its targets and the increased ferritin H subunit, which is also a protein upregulated in the response to stress, require to be further explored on a larger population. Adaptation of iron management seems involved in leukemic initiation and progression.

2.7 Acknowledgements

Ludivine Mazzilli, Gabriel Schummer and Philippe Lorimier at the Centre de Ressource Biologique of Grenoble hospital is thanked for valuable help with management of patient consents and samples.

This work was supported by grants from Université Joseph Fourier Grenoble (Programme Agir 2013), Direction de la Recherche Clinique (DRC) CHU Grenoble, and Novartis. The company played no role in the design and the interpretation of the results. EP is the recipient of a grant from the Société Française d'Hématologie (SFH).

2.8 Supplementary material

Table III-S1 Biological characteristics of patients at the AML diagnosis.
(cf. following page)

Table IV-S1. Biological characteristics of patients at the AML diagnosis

	Gender	Age	AML FAB	AML WHO	%CD34	% blast	mutation	Hemogram	Immunophenotyping	Chromosome abnormality	Cytogenetic Prognostic
P_101	M	73	AML1	1	96	92	Absence	Pancytopenia, anemia	CD13+ CD33+ CD65- CD117+ MPO+ HLA-DR+ CD34+	47, XY, t(8;21), ins 4q24, 21 trisomia.	intermediate
P_102	M	65	AML1	4	90	80	FLT3 ITD	Hyperleucocytose, erythropenia, anemia, thrombopenia	CD13+ CD33+ CD65- CD117+ HLA-DR+ CD34+, MPO-, CD133+, CD7, CD56 et CD2+/-	45, XY, 7 monosomy, t(2;3) 3q26/EVI-1.	Adverse
P_103	M	59	AML1	4	85	81	FLT3 TKD	Pancytopenia, anemia	CD13- CD33+/- CD65- CD117+ MPO+ HLA- DR- CD34+ CD4+, CD56+/-	50, XY, 8 and 10 trisomy, 6 tetrasomy, 6q anomaly, complex caryotype	Adverse
P_202	M	80	AML2	4	83	62	Absence	Pancytopenia, anemia	CD13+, CD33+/-, CD117+, CD34+	46, XY, 7q-, t(7;11)	Adverse
P_208	F	68	AML2	4	89	82	ND	Pancytopenia, anemia	CD13- CD33+ CD117+ MPO+ HLA-DR+ CD34+, CD4+/-	44, XX, del 7q, 17 monosomy, complex caryotype (many structural anomalies)	Adverse
P_401	F	07	AML4	1	80	86	FLT3 ITD	Hyperleucocytosis, anémie, erythropenia, thrombopenia	CD13+ CD33+ CD65- CD117+/- MPO HLA-DR+ CD34+, 25%: CD36, CD64 et CD14 + CD2 +/- CD7+/-	46, XX, anomaly 16p13/16q22.	favorable
P_402	M	41	AML4	1	68	85	FLT3 TKD	Hyperleucocytose, light thrombopenia	CD13+ CD33(-) CD65- CD117+ MPO+ HLA-DR+ CD34+, 30%: CD36, CD64, CD14 et CD4.	45, XY, del(7)(q32q36), inv(16)(p13q22)	favorable
P_404	M	48	AML4	1	60	59	Absence	Anemia, thrombopenia hyperleucocytose, erythropenia	CD34+, CD117+, CD13+, CD33+, HLA-DR+, MPO+ 30%: CD14+, CD64+, CD36+, CD4+, CD34+	45, XY, inv(16)(p13q22)	favorable
N_101	F	29	AML1	4	0	90	Absence	Anemia, thrombopenia hyperleucocytose, erythropenia	CD33+ CD34- CD133faible CD133- HLADR- CD45faible, 2 pop CD117/4/64	47, XX, t(9;11) (MIL/AF9), 21 trisomia	intermediate
N_207	F	65	AML2	4	37	71	FLT3ITD	Pancytopenia, anemia	CD13+ CD33+ CD65- CD117+ HLA-DR+ CD34+, MPO-, CD133+, CD4+, CD7 et CD2 +/-	47, XX, 8 trisomia	intermediate
N_401	M	87	AML4	4	0	65	ND	Anemia, thrombopenia hyperleucocytosis, erythropenia	CD13- CD33+ CD65- CD117+ MPO+/- HLADR+ CD34- CD4+ CD36+ CD64+ CD14+	48, XY, 20 and 8 trisomia	intermediate

ND: Not determined ; Absence: No mutation detected among FLT3 and NPM genes analysis

*Chapitre IV: Expérimentations
complémentaires*

Iron modulation of proliferation and
differentiation of malignant and healthy
hematopoietic progenitors in a minimal serum
free medium

Iron modulation of proliferation and differentiation of malignant and healthy hematopoietic progenitors in a minimal serum free media

1. CONTEXTE

To complete characterisation of iron network in primary AML cells, an in vitro culture medium, enabling close monitoring of available iron (depletion, repletion...) and maintaining the integrity and characteristics of seeded cells, is required. Previously, for amplification and determination of the functional iron concentration of progenitor cord blood cells, we elaborated a minimal serum free medium described in chapter II (Pourcelot et al., 2015). In such conditions, we explored the ability of healthy CD34+ cord blood progenitors and primary CD34+ blast cells to proliferate and to differentiate.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Medium culture

The medium was prepared as previously described in (Pourcelot et al., 2015) (chapter II).

2.2 Flow cytometric analysis

For immunophenotyping of isolated progenitor cells and to monitor evolution upon amplification, flow cytometry was performed with a FACS Calibur™ (Beckton Dickinson) cytometer. Cells were labelled with VioBlue-conjugated anti-CD34 antibody (Miltenyi Biotech), PE-conjugated anti-CD38 antibody (Miltenyi Biotech) and a lineage mix FITC-conjugated anti-CD3, CD19, CD56, CD13, CD14, CD11a antibody (Miltenyi Biotech). For differentiation assay, a complementary labelling was carried out with brilliant violet-conjugated anti-CD34 antibody (BD Pharmingen), FITC-conjugated anti-CD36 antibody

(Beckman Coulter), PEconjugated anti-CD235a (GPA) antibody (Beckman Coulter) and APC Alexafluor-conjugated anti-CD71 antibody (Beckman Coulter).

2.3 Differentiation assays

After amplification, CD34⁺ cells (1 x10⁵ cells/ml) were kept in the minimal medium to which the iron source or erythropoietin (Epo, 4 U/ml) were added as indicated in the text and figures. The StemMACS HSC expansion cocktail (TPO/FLT3/SCF - Miltenyi Biotech) was maintained for 10 days, and the medium was changed every three days.

2.4 In vitro erythroïd burst-forming unit (BFU-E) and Granulo-monocytic colony forming unit (CFU-GM) assays

The multipotent potential of 1000 cells was probed by suspending them in IMDM with subsequent addition to 1ml of Methocult H4434 methylcellulose medium (StemCell technologies) containing FBS, BSA, recombinant human (rh) stem cell factor, rh GM-CSF, rhIL-3, rhEpo and IMDM. The mix was distributed in three wells of four-well plates, and the developed colonies were counted after 7 and 14 days of culture at 37°C with 5% CO₂.

2.5 Cytology

Smears of progenitor cultures were fixed onto glass slides, stained with May-Grünwald-Giemsa dye, and examined by microscopy. Pictures were taken on a Carl Zeiss AxioVert 25 microscope equipped with a color ERc 5s camera.

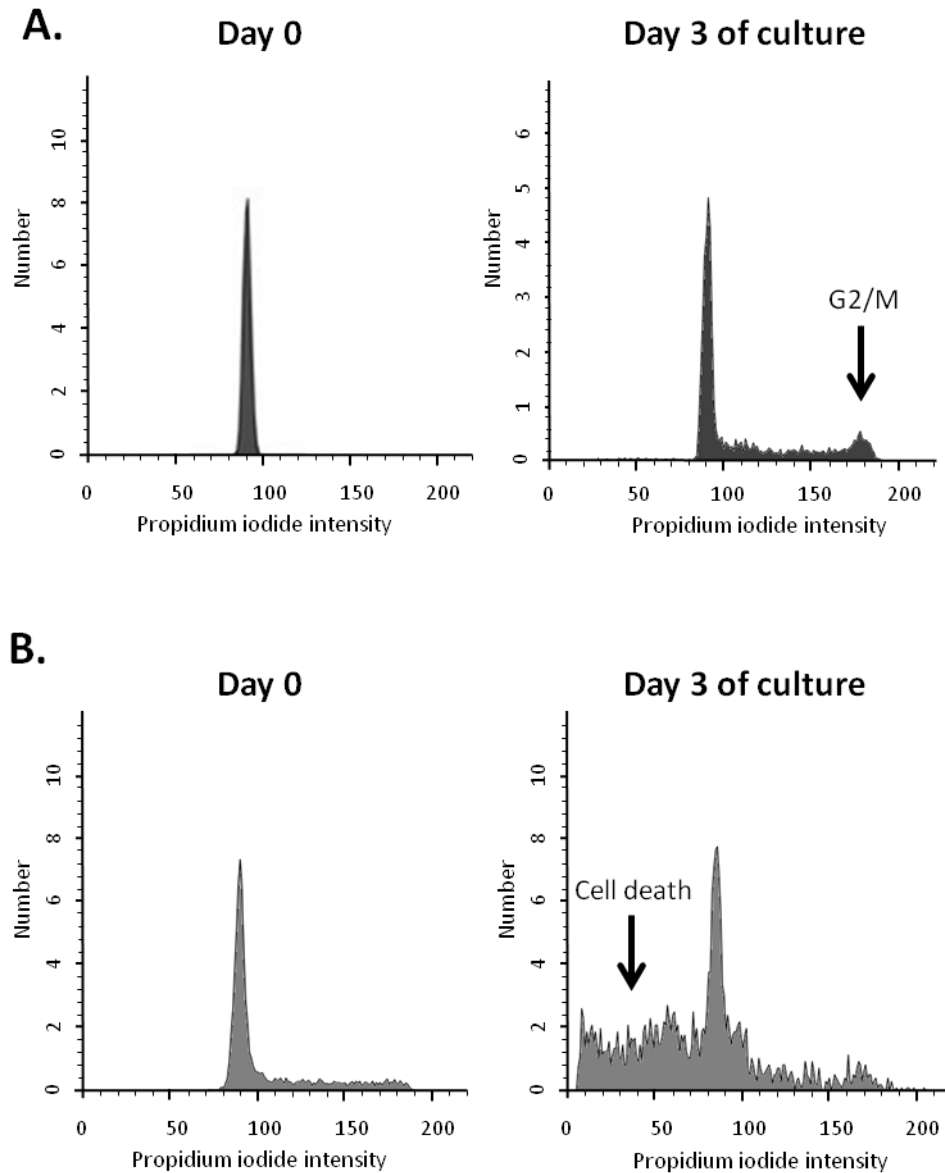


Figure IV-C1. Comparison of proliferation capacity before and after in vitro culture for 3 days in minimal homemade media.

A. Representative cell cycle of initial quiescent CD34+ cord blood cells blocked in G0/G1 phase and amplification with reappearance of S and G2/M phases after 3 days in serum free medium (IMDM, BSA, Insulin, Tf, SCF, Tpo, Flt3).

B. Representative cell cycle shows absence of proliferation of the bone marrow blasts (>60% CD34+) from one AML patient (P-101, describe in chapter III) with increase of cell debris in pre-G0/G1 phase and absence of G2/M phase for the same culture conditions.

3. RESULTS

3.1.1 Cord blood CD34⁺ progenitors grow in a minimal medium but not leukemic progenitors.

Cord blood progenitors defined as CD34⁺ cells were purified using immunomagnetic cell sorting after ficoll hypaque. These cells (minimum purity = 80%) are quiescent cells which are blocked in G0/G1 phase of the cell cycle (**Fig. IV-C1 A**) and with cells in G2/M representing less than 1%. Leukemic progenitors from bone marrow of AML patients (blasts), whatever the immunophenotyping (CD 34 positive or negative), are also weakly proliferative when isolated, as observed with the cord blood progenitors (**Fig. IV-C1 B**).

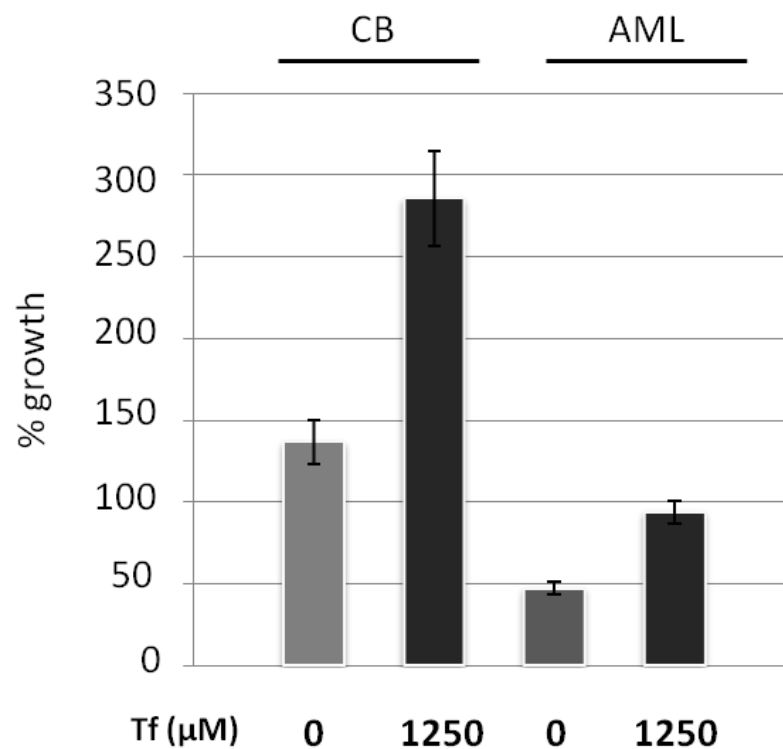


Figure IV-C2. Comparison of the growth of progenitors.

The panel shows the increase of viable cells (%) after 3 days in the serum free medium for CD34⁺ cord blood cells with sufficient Tf concentration (Tf 1250, n=10) or with residual iron contained in the media (Tf 0, n=5), and decrease of viable cells in the same sufficient Tf condition for CD34⁺ leukemic progenitors (n=2).

Expérimentations complémentaires

When the cord blood progenitors were seeded in the minimal serum free medium, proliferation occurred (**Fig. IV-C1 A**). Without iron provided by transferrin (Tf), viability of cells was maintained and cells transiently proliferated on iron stores accumulated before isolation. But it was only with addition of large iron amounts (1.25 μ M Tf corresponding to 2.5 μ M iron) that amplification of cells up to 3-fold was observed after 3 days (**Fig. IV-C2**).

In contrast, assays for culture preservation and amplification in the same conditions with CD34⁺ leukemic cells failed to give similar results to cord blood cells. The leukemic progenitors lost viability over 3 days with 48% (SD=5, n=2) and 25% (SD=11, n=2) proportion of death cells, without and with 2.5 μ M iron supply, respectively, at day 3. However, with added iron, cells progressively recovered and grew to reach their initial count 5 days after seeding. A specific, but indeterminate, clone was probably selected. Without iron addition, leukemic progenitors died with only 20% of the initial CD34⁺ cells remaining 5 days after seeding, as observed by the intensity of the preG0/G1 phase of the cell cycle (**Fig. IV-C1 B**). These results were obtained with cells of a primary AML (type 1 according to FAB classification; patient P-101 from chapter III). Significantly, a similar assay with cells of the AML transformation from a myelodysplastic syndrome, associated with large iron provision by transfusions, also did not allow us to maintain or amplify the CD34⁺ cells without or with ample iron concentration. Cellular loss was evaluated to 45% at day 3 and 80% at day 5. In both cases, initial cells were almost exclusively CD34⁺/CD38⁺.

Another assay was conducted with cultured CD34⁺ cells isolated from the primary AML (P-101). At day 5, IL-3 (20 ng/ml) was added and the cells were splitted in two, one batch receiving 1.25 μ M transferrin and the other none. At day 7, without Tf, IL-3 was unable to support proliferation and viability continued to drop. In contrast, with the large iron supply provided by transferrin, proliferation occurred with characteristics similar to that of the cord blood progenitors. These results suggest AML progenitor cells require specific conditions for amplification in the described minimal medium, in contrast with cord blood progenitors that proliferate in these minimal conditions.

3.1.2 Transferrin dependence of the differentiation of cord blood CD34⁺ progenitors

Next, the possible bent of isolated CD34⁺ cord blood cells to mature was evaluated as a function of iron availability and with the mere addition of erythropoietin (Epo) in the same minimal medium. After amplification for 3 days with 1.25 μ M Tf provision and in the absence of Epo, the proportion of CD34⁺ cells later started to decrease in all implemented experimental conditions, *i.e.* irrespective of the presence of Tf or Epo (**Table IV-C1; Fig. IV-C3**). The loss of the CD34 marker is taken as a sign of hematopoietic differentiation. But in all experiments the cells remained lineage negative (Lin⁻) at more than 90%, indicating no ultimate differentiation into a specific lineage among the lymphoid, monocyte/macrophage, and megakaryocyte/platelets ones (**Table IV-C1**). Immuno-phenotyping at different times after Tf or Epo addition did not evidence large differences in the monitored surface markers (**Table IV-C1**). However, the proportion of CD36⁺ in pre-amplified cells increased after a week under limited Tf concentration (15 nM), independently of the presence of Epo. This increase was not observed without Tf (**Table IV-C1, Fig. IV-C3**).

Table IV-C1. Proportion of selected surface markers present in purified CD34 progenitors kept for a week in liquid culture as described in Materials and Methods.

	Day 0	Day 7			
		Tf (-)		Tf (+)	
		Epo (-)	Epo (+)	Epo (-)	Epo (+)
% CD34	94.5	53.2	33.7	28.8	30.4
% CD36	15.9	5.2	6.2	38.8	42.5
% CD235 (GPA)	0.3	1.0	0.8	1.2	2.6
% CD41	ND	17	ND	10.5	9
% Lineage	1.65	2.65	6	4.95	9.7

ND : not determined ; Lineage includes CD3 / CD19 / CD56 / CD13 / CD14 / CD11a

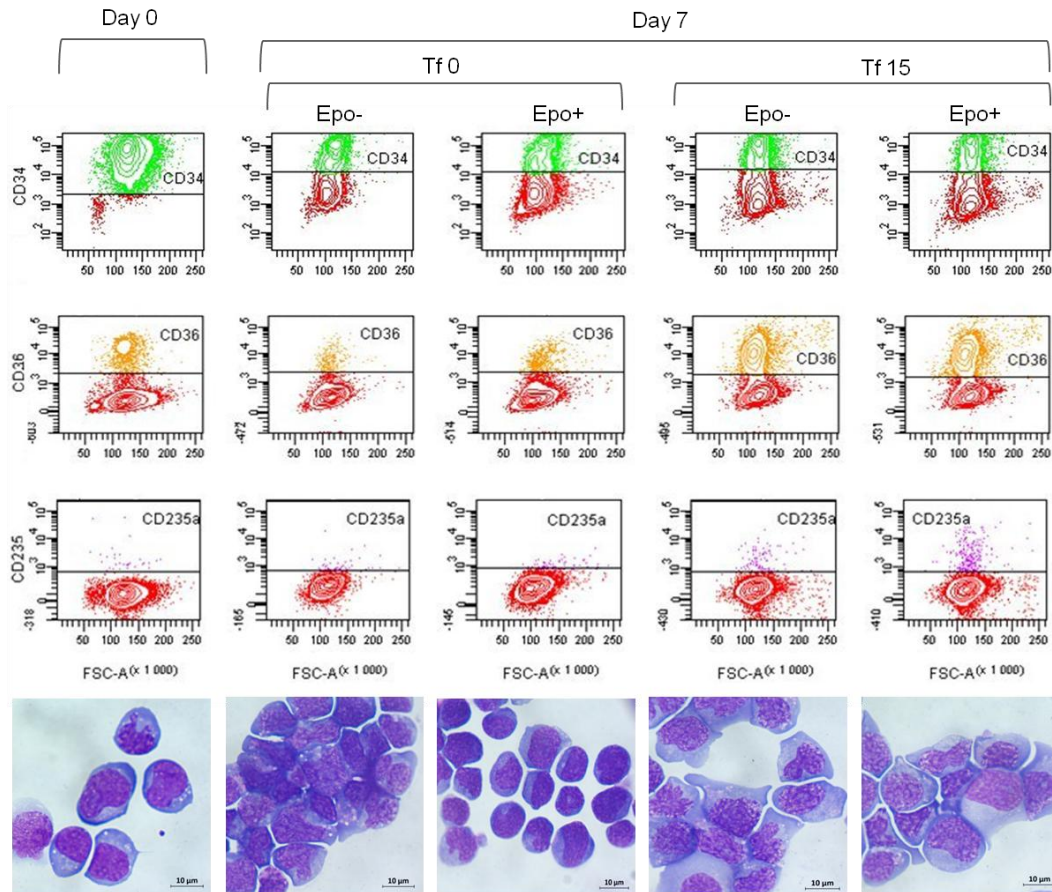


Figure IV-C3. Erythroid commitment of CD34+ cord blood cells according to iron provided by transferrin and to erythropoietin.

Evolution of selected surface markers by flow cytometry analysis after amplification for 3 days (Day 0), and then after 7 more days (Day 7) in culture without holo-transferrin (Tf0) or with 15nM holo-transferrin (Tf15). From day 0, in both transferrin conditions, erythropoietin was added (Epo+) or not (Epo-). Below each condition, cell morphology is illustrated by representative pictures of cells stained with MGG.

When Tf was substituted by apo-Tf, which does not provide iron by itself, similar results as with low amounts of holo-Tf were obtained. Thus, the Tf-related increase of CD36, coupled to the loss of CD34 and the very small variations of the other markers, indicate early commitment into the erythroid lineage. But, with limited Tf-iron input in the timeframe of the experiment, Epo is probably necessary, but certainly not sufficient, to deeply engage progenitors into the erythroid lineage. Indeed, glycophorin A (CD235), the marker of advanced erythroid differentiation, remained low under all experimental conditions, implying minimal maturation to the CFU-E stage between 4 and up to 10 days after amplification with

Expérimentations complémentaires

1.25 μ M Tf, irrespective of Epo presence. Later on, slight increases (up to ca. 10%) of this CD235 marker were detected. The minimal commitment of the CD34⁺ cells in liquid culture into the erythroïd lineage was further borne out by cytological monitoring (**Fig. IV-C3**). The purified CD34⁺ cells enlarged and developed marked nucleolus and vacuolar vesicles, while keeping a moderate nucleus/cytosol ratio on a mainly basophilic background. This is congruent with mitosis-prone cells and minimal differentiation. Indeed, no color changes of the cytoplasm indicating hemoglobin synthesis were detected.

The myeloid multipotent characteristics of the cells (CFU-GEMM characteristics), kept for a few days under limiting iron provision, were borne out by their ability to develop into CFU-GM and CFUE colonies in methylcellulose filter assays (**Table IV-C2**). These assays were started with cells kept with less than 15 nM (apo- or holo-) Tf between amplification and seeding. They were carried out in a complete medium suitable for advanced maturation (describe in materials & methods).

Table IV-C2. Granular and erythroïd colony grown on methylcellulose filters in complete medium from CD34 progenitors.

The assays were set up as described in Material and Methods and the BFU/CFU colonies counted after one or two weeks. The data of a single experiment are reported as different numbers of cells were seeded in different experiments, but the results were found to be qualitatively similar for different CD34 cell batches.

Day 7				Day 14			
Holo -Tf 0nM		Holo -Tf 15nM		Holo -Tf 0nM		Holo -Tf 15nM	
CFU-GM	BFU-E/CFU-E	CFU-GM	BFU-E/CFU-E	CFU-GM	BFU-E/CFU-E	CFU-GM	BFU-E/CFU-E
27	6	29	12	25	14	32	20

3.1.3 Iron modulation is not sufficient to engage differentiation in short term cultures of one primary AML

CD34 positive cells from a primary AML did not show significant variations of the percentage of CD34 cell surface marker (>90%) for 3 days with or without iron provision. A transient increase of glycophorin A, from 1.2% 24 hours after seeding to 19% at day 5 before disappearance, was observed. But CD36 or others erythroïd markers were not increased. There were no obvious signs of commitment into other lineages due to absence of mature cell surface markers (lineage labelling). At day 10, the CD34 percentage remained above 90% of the viable cells in the presence of 1.25µM Tf, and above 70% at day 7 without Tf. In both cases the cells highly expressed transferrin receptor (CD71 >96%). However, cytological analysis showed morphological changes (**Fig. IV-C4**). At the time of isolation, two types of cells coexisted, one with a basophilic aspect and a moderate nucleus/cytosol ratio, and the other, enlarged, more acidophilic, with a low nucleus/cytosol ratio. Both types presented nucleolus and vacuolar vesicles. From day 3 onward, one of the two cell populations became predominant, with very clear granulations and vacuolar vesicles.

The addition of interleukin 3 enhanced proliferation, but it also increased lineage commitment to 20% of cells between days 5 and 7. This commitment is associated with production of CD13, a cell surface maker of granulocytes and monocytes. Together with cytological modifications, these results are more suggestive of the selection of a clone of blast cells which is able to grow in this medium, rather than of a true differentiation.

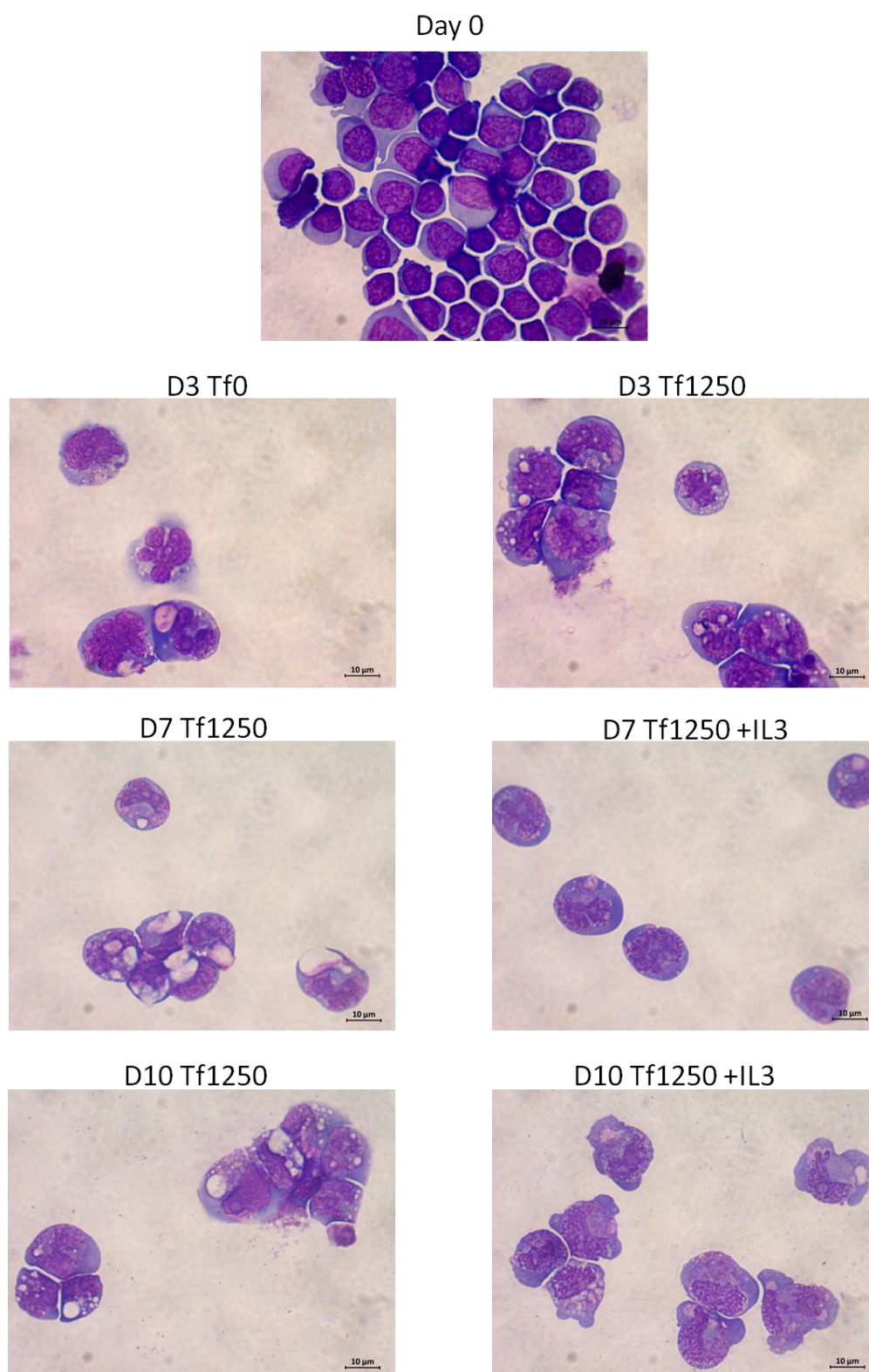


Figure IV-C4. Cytological observations of primary AML cells after short time culture.

Cell morphology is illustrated by representative pictures of cells stained with MGG at day 0, 3, 7 and 10 of in vitro culture with different Tf and IL-3 addition.

4. DISCUSSION

Commonly in biological and clinical haematology practice, blasts are falsely considered as active cells with strong ability to proliferate, and contributing to the medullar, blood and extra-medullar invasion. But using immuno-deficient mouse xenotransplantation model, heterogeneity of leukemic cells has been demonstrated for at least ten years with discovery of a rare distinct subset of malignant cells with high tumor growth potential : the leukemic stem cells (LSC) (*Bonnet and Dick, 1997; Guan et al., 2003; Jordan and Guzman, 2004; Lapidot et al., 1994*). These highly heterogeneous cells are predominantly quiescent which confers a strong advantage to resist to chemotherapy which targets proliferating cells: they are thus prone to support relapse of leukemia (*Eppert et al., 2011; Gentles et al., 2010*). The LSC are at the origin of blast population after minimal differentiation, and they share the same properties of quiescence and self-renewal than hematopoietic stem cell (HSC). In agreement with *Guan et al.*, all AML blasts studied here are quiescent independent of their CD34 status. The cell cycle is blocked at the G1/S check point, as for the control progenitors from cord blood which are the closest to the HSC. LSC are probably included in the studied CD34⁺ AML cell populations, but they represent a very small subset. The phenotypic advantage of AML blasts is mainly due to resistance to cell death. One of mechanisms described in primary AML to explain survival, is the activation of NF- κ B transcription factor in CD34⁺ AML cells and leukemic stem cell (LSC), while NF- κ B is inhibited in normal CD34⁺ progenitors (*Guzman et al., 2001*). However, even if CD34⁺ AML cells and CD34⁺ cord blood cells are both quiescent, cord blood cells can readily re-enter into the cell cycle, even in the nutrient-poor minimal serum free medium supplemented with growth factors (SCF, TPO, Flt3). CD34⁺ AML cells fail to do so. This minimal serum free medium was elaborated to amplify and maintain normal hematopoietic progenitors by controlling iron supply, with the aim of studying the importance of this parameter (*Pourcelot et al., 2015*).

Expérimentations complémentaires

This ability to enter into the cell cycle is in part bound to the activation of c-kit, a tyrosine kinase receptor activated by SCF. This activation triggers proliferation by regulating cyclin-dependant kinase inhibitors (CDKI), such as p57^{kip2} (*Eliasson and Jonsson, 2010*). The TPO growth factor acts also on p57^{kip2}. Moreover, TPO and SCF act on the stabilization of the Hypoxia Inducible Factor 1 α (HIF1 α), a transcription factor implicated in various pathways among which proliferation is promoted by indirect action on another CDKI, p21^{waf1/cip1} (*Eliasson and Jonsson, 2010*). Flt3 and SCF, ligands of two tyrosine kinase receptors, promote cell proliferation by activation of the RAF/MEK/ERK pathway. Both ligands are also responsible for cell survival due to activation of the PI3 Kinase pathway. In AML, several specific mutations can lead to the activation of these pathways. Thus, one explanation for the absence of CD34⁺ AML cell proliferation could be the differential expression of ligand-activated cell surface markers and downstream signalling cascades between LSC and HSC.. Indeed, it has been shown that LSC do not express c-kit (CD117) (*Chan and Huntly, 2008*), and SCF is inactive on these cells. Nevertheless, the predominant blasts in the CD34⁺ AML cell populations were defined as CD117 (c-kit) positive, and conditions for long term maintenance of AML stem cells until 4 weeks use SCF in the cytokine panel (*Ito et al., 2015*). Thus the absence of c-kit does not explain the absence of growth and the death of the CD34⁺ AML cells in the present culture conditions.

The cytokine cocktail used in the present assay is probably not suitable for LSC. It has also been reported that LSC, and not HSC, express the receptor to interleukin 3 (CD123) (*Chan and Huntly, 2008*). IL-3 may be required in the AML cell culture as suggested by the results of *Ito et al.*, who were able to maintain the (CD34⁺/CD38⁻ and CD34⁺/CD38⁺) phenotype of leukemic cells for at least 2 weeks. This is borne out here by the increase of the growth rate but with the partial change of immunophenotype toward the monocytic lineage. This result reminds of that described by *Callens et al.* with a chelating agent and vitamin D. Maybe, in addition to the IL-3 requirement, AML progenitors need larger amounts of iron than normal cells, or others components are missing that cannot be provided the home-made medium we

have used. Moreover, it has been suggested that long term culture initiating cells belong to the CD34⁺/CD38⁻ subpopulation (*Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994*). In contrast, the leukemic cell populations studied here were almost exclusively CD38⁺. Others suggest the LSC may reside in CD34⁻ fraction, in particular for patients with mutated nucleophosmin (*Taussig et al., 2010*). Overall, since the complexity of the different subsets of AML cells is not resolved, the conditions for proper growth in cultures are not straightforward. But clearly AML cells have specific needs to re-engage in cell cycle that cord blood CD34⁺ cells have not. These requirements are fulfilled by serum in others studies, or through the micro-environment generated by mesenchymal stromal cell (MSC) in co-cultures. Indeed, several studies evidenced the possibility of long term liquid culture, up to 6, 8 or 15 weeks, but with large differences among AML cells from different patients, in particular depending on the FAB AML subcategories (*Ito et al., 2015; van Gosliga et al., 2007*). *vanGosliga et al.* obtained active proliferating cells, up to 45 fold amplification, but with a phenotyping change. Initially CD34⁺/38⁻, cells became fully CD34⁺/38⁺ after 20 weeks without sign of mature lymphoid, erythroïd or myeloid differentiation.

In addition, the leukemic cells cannot proliferate in the in vitro conditions defined in this work, and they cannot be directed to early differentiation either. Indeed, CD34⁺ cord blood cells spontaneously show variation of cell surface marker after one week of culture, with loss of the CD34 marker. These variations are iron dependent and preferentially directed towards the erythroïd lineage. As it might have been anticipated, leukemic cells predominantly stay CD34⁺, but without addition of specific, such as IL-3, and also partly uncharacterized components in the culture, the serum free medium was not able to support spontaneous short-term (<10 days) differentiation of primary leukemic cells.

Last, although to the implemented culture conditions could not support amplification of primary leukemic cells, the maintenance of these cells for a few days should allow to act on the iron management, with chelating agents for instance, to characterize the response of the IRE-IRP system in these cells to stress conditions.

Discussion générale et perspectives

Nombreux sont les dogmes sur les cellules leucémiques faisant état de cellules considérées comme très prolifératives et nécessitant une forte concentration en fer pour assurer cet état de croissance, alors même que la démonstration de la faible capacité proliférative des cellules blastiques, dont seule une sous-population à l'origine des clones leucémiques possède une modeste capacité d'amplification, a été établie depuis longtemps (*Guan et al., 2003*). Quant aux réels besoins en fer pour ce type de cellules il est totalement inconnu à ce jour. Pourquoi des cellules très majoritairement dans un état de quiescence auraient-elles des besoins conséquents en fer ?

Or, comme en témoignent, les travaux de *Callens et al.* sur l'induction de la différenciation lors de la privation des cellules leucémiques en fer *in vitro* et *in vivo* (essai sur un patient), un lien semble exister entre la régulation de l'utilisation du fer, l'équilibre d'oxydoréduction et la balance prolifération/différenciation des cellules leucémiques. Néanmoins, les détails mécanistiques et l'implication du réseau fer avec notamment son système régulateur IRE-IRP ne sont pas connus dans les LAM, ce qui empêche pour l'instant la rationalisation des approches thérapeutiques pouvant cibler des voies plus focalisées et potentiellement efficaces, que la simple inhibition du cycle cellulaire sans discrimination.

Ce travail de thèse s'inscrit dans une nouvelle démarche faisant intervenir une double approche, expérimentale et de modélisation (cette dernière non présentée ici), afin d'évaluer et de formaliser ces réseaux complexes de régulation du fer et de l'équilibre redox dans les cellules leucémiques myéloïdes. Le but est d'élucider les mécanismes permettant aux blastes de proliférer, même faiblement, tout en échappant au processus de différenciation, et de définir ainsi les cibles thérapeutiques les plus adaptées. Issus de la collaboration de plusieurs équipes de recherche Grenobloises, les résultats présentés à travers ce manuscrit, qui concernent majoritairement la partie biologique tout en utilisant quelques suggestions issues de la partie modélisation, représentent les premiers travaux de ce nouvel axe de travail de biologie systémique et intégrative.

Nous nous sommes tout d'abord focalisés sur le réseau fer dont nous avons caractérisé, notamment quantitativement, l'état du système régulateur intracellulaire dans deux modèles de lignées leucémiques, d'une part à l'état de base c'est à dire lors de la phase de prolifération des cellules, et d'autre part en état de carence en fer induisant un arrêt de croissance de ces cellules. A partir de cette caractérisation, nous nous sommes attelés à déterminer un paramètre essentiel à la cellule hématopoïétique normale ou leucémique: le seuil de concentration fonctionnelle en fer. Il est apparu que ce seuil est à la fois celui qui détermine la prolifération cellulaire, et celui qui déclenche l'activation du système de détection du fer disponible aboutissant sur les IRP. Aussi, une première description du système IRE-IRP a été entreprise au sein de cellules leucémiques issues de patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes en comparaison des cellules hématopoïétiques immatures non tumorales issues de sang de cordon et de moelle osseuse de témoins sains.

1. UN SYSTEME REGULATEUR IRE-IRP ACTIF, FONCTIONNEL ET SOUS LA DEPENDANCE DE LA CONCENTRATION EN FER

Les différents composants du système régulateur ont été étudiés et mesurés au sein de cellules leucémiques. Ainsi, l'existence *in vitro* d'une activité des régulateurs Iron Regulatory Proteins endogènes a été démontrée aussi bien sur des cellules à forte capacité proliférative comme les lignées cellulaires K562 et KG1, que sur les cellules leucémiques quiescentes issues de patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes. Les cellules progénitrices non leucémiques, qu'elles soient issues de sang de cordon ou de moelle osseuse, et dont l'état de prolifération se rapproche plus particulièrement des cellules leucémiques de patient, font également état d'une activation des IRP qui s'avère moins importante que l'état d'activation dans les cellules primaires leucémiques, et peut être de la lignée KG1 en se référant uniquement au transcrit TfRC. Cela devrait traduire théoriquement une capacité supérieure à capter et utiliser le fer pour ces cellules tumorales en comparaison des cellules saines dont elles dérivent.

Toutefois l'étude des concentrations protéiques de Ft et TfR1, les deux protéines majeures de l'homéostasie du fer dont la production est régulée par les IRP ne montre pas d'augmentation dans les cellules leucémiques. De même la comparaison du transcrit TfRC entre cellules patients (n=11) et témoins de sang de cordon (n=4) ne montre pas de différence significative, alors même que le mécanisme de stabilisation de l'ARNm TfRC par les IRP actifs fait de ce transcrit un témoin direct de l'état d'activation du système régulateur. Ainsi, plus d'activité IRP est nécessaire aux blastes pour maintenir une gestion cellulaire du fer similaire à celle des cellules saines correspondantes.

Considérant notre résultat sur les modèles cellulaires leucémiques démontrant l'excès de régulateur IRP1 total (forme non active aconitase et forme active liant les IRE) par rapport aux transcrits cibles, et nos quantifications par qPCR de ces cibles montrent clairement un profil transcriptionnel conservé pour les types cellulaires étudiées avec une large prédominance des ARNm des sous-unités de ferritine, cela suggère qu'une activité IRP supérieure rapproche encore plus le système de la saturation de ses cibles IRE.

D'autre part nous avons observé une régulation effective *in cellulo* des IRP endogènes actifs sur des ARNm exogènes portant un IRE en 5' de la séquence codante et capables de révéler la répression exercée par les IRP, bien que celle-ci soit faible dans les conditions expérimentales définies. Pour les lignées cellulaires étudiées, une augmentation de la concentration d'IRE ne perturbe pas l'efficacité de régulation par les IRP sur les IRE. Nos mesures *in cellulo* ne révèlent donc pas de redistribution des IRP vers des cibles IRE privilégiées comme pouvaient le suggérer les résultats de *Goforth et al.*, dont les auteurs démontrèrent *in vitro* une gamme de constantes de dissociation IRP 1-IRE balayant un ordre de grandeur sur les IRE en 5' et donc une différence potentielle du contrôle de la traduction des ARNm (*Goforth et al., 2010*). L'influence du type cellulaire et l'état cellulaire (sain ou malin) doit donc être considéré sur la base de ces résultats, car d'une part il a été démontré une activité régulatrice plus importante pour FTH1 qu' ACO2 dans les cellules hépatiques normales (*Wallander et al., 2006*), et d'autre part, l'existence de modulation de la régulation IRP-dépendante avec une traduction de l'ARNm FTH1/FTL moins sensible à l'activation par le fer que la traduction de l'ARNm de ALAS2 dans les étapes terminales de la différenciation des progéniteurs érythroïdes murins (*Schranzhofer et*

al., 2006). A noter cependant que toutes les cibles des IRP n'ont pas été quantifiées dans notre travail et qu'à l'heure actuelle toutes les cibles de ce système n'ont probablement pas été identifiées, ce qui n'exclue pas l'existence d'un remodelage des quantités de transcrits, ni une redirection de l'action des IRP vers des cibles inconnues.

En situation de carence en fer par le traitement deferoxamine, l'activation et le fonctionnement du système IRE-IRP sont confirmés, du moins pour les lignées cellulaires. La carence n'a pas mis en évidence l'intervention d'IRP2 dans les cellules leucémiques. Il en est de même pour les cellules progénitrices témoins issues de sang de cordon, dont les quelques expérimentations (n=2) de carence après induction de la prolifération par adjonction de cytokines spécifiques, conduisent également à une activation d'IRP1 et un effet régulateur visible indirectement par d'une part la décroissance de la ferritine d'un facteur 5, et d'autre part l'augmentation du TfR1 d'un facteur 4. Basé sur l'évolution de ces deux protéines, l'effet régulateur paraît plus marqué pour les cellules témoins de sang de cordon en comparaison des lignées cellulaires, ceci pourrait être lié à la différence de l'état prolifératif avant déplétion en fer qui traduit des besoins initiaux en fer différents. D'autres expérimentations parallèles sur les deux types cellulaires seraient nécessaires pour confirmer ce dernier résultat, et notamment les mesures conjointes d'activité IRP, mais le manque de matériel primaire n'a pas permis cela pour l'instant.

Les expérimentations de carence puis réintroduction de fer montrant une variation de l'activité IRP selon la concentration en fer ajoutée, associée aux variations des protéines d'intérêts correspondantes, vont également dans le sens d'un système régulateur présent et sous la dépendance de la concentration en fer. De plus, même si elle est faible, l'augmentation du taux de transcrit TfRC après carence peut refléter l'effet des IRP, ce qui se traduit surtout au niveau protéique par une concentration 3 à 4 fois supérieure du récepteur de la transferrine. De même, l'observation de variations des concentrations protéiques comme la diminution de moitié de la ferritine est le signe attendu de l'activité répressive des IRP sur cette cible.

L'ensemble de ces données démontrent que le système IRE-IRP est actif au sein des modèles leucémiques utilisés *in vitro*, qu'il est fonctionnel, et sous la dépendance

de la concentration en fer. Les résultats *ex vivo* des cellules primaires montrent également un système IRE-IRP actif mais dont la fonctionnalité reste à caractériser.

2. ABSENCE DE STRESS OXYDANT APRES CARENCE EN FER POUR LES DEUX MODELES

In vitro les effets de la carence en fer sur la production cellulaire d'espèces réactives de l'oxygène apparaît comme très variable dans les LAM, comme dans les syndromes myélodysplasiques (MDS), car très dépendant des conditions d'exposition dont la durée. Dans les LAM, *Callens et al.*, observèrent *in vitro* sur d'autres lignées cellulaires, une augmentation des ERO dépendante de la concentration et du temps d'exposition de DFO (*Callens et al.*, 2010). Il en fut de même dans les cellules CD34+ de MDS (*Pullarkat et al.*, 2012) exposées au deferasirox (DFX), alors que *in vivo* un essai clinique observa une diminution des ERO dans les globules rouges associé à une augmentation du glutathion des cellules périphériques après trois mois de traitement par DFX (*Ghoti et al.*, 2010). Comme le suggèrent *Pullarkat et al.*, les effets des chélateurs du fer sur les changements redox différent peut être *in vivo* de ce qui a été observé *in vitro* sur une exposition à court terme (*Pullarkat et al.*, 2012).

Dans notre travail et en se fiant à quatre paramètres nous n'observons pas d'apparition de stress oxydant après carence pour les deux lignées. En effet, nous avons premièrement des transcrits de l'hème oxygénase 1 (HMOX1) très faiblement représentés dans les deux lignées et non affectés par la carence. Or, HMOX1 est induit par différents stress et participe aux défenses antioxydantes notamment par l'intermédiaire de l'un des produits ultimes de son activité de dégradation de l'hème, la bilirubine (*Haines et al.*, 2012; *Kikuchi et al.*, 2005). Deuxièmement, le gène HILPDA dont les transcrits ne montrent pas de variations après carence, est un marqueur de l'hypoxie sous la dépendance d'HIF 1 α (*Gimm et al.*, 2010). Troisièmement, les mesures de peroxydation lipidique ne montrent pas de variations, avant et après carence, de l'oxydation des lipides. Et quatrièmement, la mesure des ERO par la carboxyH₂DCF-DA montre l'absence de production d'ERO après 24h de carence en fer, voire une légère diminution de ceux-ci. Ce dernier résultat est en accord avec les mesures à long terme du groupe de Callens, observant une

augmentation transitoire des ERO pour une exposition à court terme au deferasirox (90 minutes) et au contraire une diminution après 16h d'exposition des lignées NB4 et OCI-AML3 (*Callens et al., 2010*).

Ces résultats sont à mettre en parallèle avec l'absence de variation du taux de glutathion total pour K562 et même sa diminution pour KG1 après carence en fer, avec une différence franche du taux basal de glutathion entre les deux lignées. Ceci confirme l'absence d'induction d'une situation pro-oxydante après 24h de traitement par chélateur dans les cellules viables, et montre également la différence de capacité entre les deux lignées à répondre à un éventuel stress oxydant dans un bref délai. A l'image de la différence supposée entre LAM et MDS vis à vis de la sensibilité au changement redox pouvant expliquer un effet sélectif sur la différenciation après carence, il est possible que les deux lignées ne soient pas sensibles de la même façon aux variations du fer disponible et n'y répondent pas de façon identique, notamment au niveau de l'équilibre d'oxydoréduction, témoignant de la différence de leur nature.

3. UN DESTIN CELLULAIRE DIFFERENT MAIS UN BESOIN ELEMENTAIRE EN FER IDENTIQUE

Les arguments rassemblés dans ce travail montrent le lien qui existe entre disponibilité du fer et déroulement du cycle cellulaire sans que les concentrations de métal pertinentes n'aient été évaluées précédemment. Cette concentration en fer participe à l'établissement des conditions nécessaires à la prolifération cellulaire ou à la différenciation, voire à la quiescence ou la mort. Elle correspond donc à la quantité de fer nécessaire pour supporter la croissance et est en lien avec l'activité du système régulateur IRE-IRP. Ainsi, l'accumulation des données de mesure de paramètres endogènes que sont la densité, la mesure de concentration intra-cellulaire en fer, l'activation des IRP, l'évolution du cycle cellulaire, sur les modèles cellulaires utilisés après carence converge vers un intervalle de concentration assez étroit.

Ainsi après avoir éliminé la source d'approvisionnement en fer de la cellule et forcer celle-ci à consommer ses réserves au point d'arriver à un stade où ses besoins ne sont plus satisfaits pour soutenir la croissance, le seuil en fer correspondant à cet état a été estimé après ré-apport de transferrine saturée. La conjugaison de la reprise de la croissance avec un déblocage du cycle, de l'augmentation du fer intracellulaire et de la diminution de l'activité du système régulateur IRE-IRP évaluée par l'activité IRP ajoutées à l'évolution de la Ft et du TfR, nous permet d'affirmer qu'entre 10 et 20nM d'apport de fer pour la lignée K562, et moins de 5nM de fer pour la lignée KG1, via la transferrine, permettent le maintien de la viabilité cellulaire et l'induction d'un état prolifératif. Ces mesures prennent en compte le fer résiduel de l'environnement extracellulaire, pour lequel la disponibilité au maintien des besoins cellulaires n'est pas satisfaite en l'absence de transferrine sans fer (apoTf). Et au delà d'un apport transitoire d'environ 20nM par l'apoTf, ce fer résiduel pris en charge par l'apoTf est limitant. Cet ordre de grandeur d'une dizaine de nanomolaire de transferrine permettant la survie et la croissance cellulaire n'est pas une spécificité des cellules leucémiques. Nos mesures sur la lignée cellulaire HeLa, cellules adhérentes de tumeur solide, et sur les progéniteurs hématopoïétiques sains de sang de cordon, donnent un intervalle de 1 à 5 nM de transferrine, comme pour les cellules KG1. Ceci prouve que les cellules leucémiques n'ont pas de besoins en fer supérieurs à des cellules non leucémiques, mais ne signifie pas pour autant que la gestion au niveau cellulaire, notamment du système IRE-IRP, ne soit pas modifiée. La modeste différence quantitative observée pour la lignée K562 par rapport aux autres cellules étudiées est très probablement le reflet d'une adaptation en lien avec la nature de cette lignée, discuté ci-dessous.

Si l'on poursuit au-delà de l'initiation de la croissance cellulaire, on note un décalage entre la concentration de Tf nécessaire déclenchant la prolifération et la concentration à partir de laquelle le fer s'accumule au sein de la cellule. Entre les deux se situe un intervalle de concentration dans lequel le stockage ne se produit pas. Utilisant les données expérimentales précédentes et un effort de formalisation des expressions cinétiques décrivant le système étudié, cette concentration fonctionnelle en fer est établie à 61nM pour K562 et 10nM pour KG1, correspondant respectivement à 30nM et 5nM de transferrine saturée ajoutée. Il s'agit un seuil de déclenchement de l'activité régulatrice IRP très proche de la concentration en fer

ajoutée permettant le ré-engagement de la prolifération. Dans tous les cas, on peut affirmer que la concentration fonctionnelle en fer est de l'ordre de quelques dizaines de nanomolaire, au plus.

Ces valeurs sont très inférieures à celles attribuées au fer labile intra-cellulaire (*labile iron pool*), estimé autour de $1,5\mu\text{M}$ par *Epsztejn et al.*, pour K562 (*Epsztejn et al.*, 1997). Ce pool n'est qu'une petite partie du fer total intra-cellulaire, et nos mesures de fer intra-cellulaire total révèlent à l'état de prolifération des concentrations de $28\mu\text{M}$ et $48\mu\text{M}$ pour KG1 et K562, respectivement. De ce point de vue, nos mesures sont en accord avec ce que l'équipe de Cabantchik a déterminé pour le fer intracellulaire total des K562 de $35\mu\text{M}$ (*Epsztejn et al.*, 1997). A notre connaissance la concentration en fer total intra-cellulaire pour KG1 n'avait jamais été estimée. On note également qu'en considérant la valeur de référence biologique de la concentration de transferrine plasmatique, établie à environ 3g/l soit 1.6g/l dans le sang total, on calcule une concentration théorique sanguine de transferrine de $20\mu\text{M}$ et une concentration théorique sanguine en fer total de $13\mu\text{M}$, en tenant compte des 30% moyen de saturation de la transferrine.

Cette concentration de l'ordre du micromolaire dans l'environnement cellulaire (au niveau périphérique et par extrapolation au niveau médullaire), comparée aux apports suffisants en fer via la transferrine de l'ordre du nanomolaire (mesurés dans ce travail), confirme en condition physiologique l'excès de disponibilité du fer pour le développement des cellules leucémiques par rapport aux réels besoins cellulaires. Ceci suggère qu'il faudrait minimiser les apports en fer notamment après chimiothérapie ou greffe afin d'éviter de favoriser la prolifération des clones leucémiques résiduels, dans les limites d'une atteinte des cellules saines avec principalement la limite d'une anémie tolérable pour le patient. Toutefois, ces données montrent que l'idée de l'efficacité du traitement par chélateur repose sur une pseudo sélectivité de capacité des cellules normales à mieux tolérer la déplétion que des cellules tumorales. Ceci est en partie inexact, car elle repose sur le concept de besoins accrus pour satisfaire une augmentation de croissance, et plus de récepteur de la transferrine pour cela, ce qui n'a pas été observé dans le panel de malades que nous avons étudié. Ainsi, même si la restriction de fer peut éliminer une partie des cellules tumorales, la déplétion sera toujours insuffisante à l'élimination des clones malins sans atteinte des cellules saines.

La connaissance du niveau de fer suffisant aux besoins cellulaires présente un intérêt dans les pratiques cliniques. Ainsi, dans les cas de transfusions répétées, rencontrés par exemple dans les myélodysplasies, l'utilisation de cette estimation de la concentration fonctionnelle en fer pourrait permettre une meilleure adaptation du niveau de chélateur afin d'assurer un maintien de l'homéostasie du fer tout en minimisant les risques de stress cellulaire et d'évolution maligne. La pratique actuelle nécessite un suivi constant des doses de chélateurs qui peuvent, sur le long terme, causer des atteintes oculaires, auditives, rénales et hépatiques (*Chaudhary and Pullarkat, 2013*). C'est également le cas dans les LAM où le traitement par chélateur est envisagé. Dans de telles pathologies où l'on recherche un ré-engagement de la différenciation, il sera d'autant plus important d'avoir un bon ajustement de la dose de chélateur que, comme nous l'avons vu précédemment, cette différenciation est sensible au potentiel redox, qui dépend de la concentration et du temps d'exposition au chélateur (*Chaston et al., 2004*). L'estimation du seuil de fer soutenant la prolifération cellulaire dans des conditions cliniques permettrait également d'approcher la supplémentation en fer adéquate à apporter aux patients souffrant d'anémie, d'insuffisance rénale ou toute autre pathologie marquée par une carence en fer. En effet, à ce jour, la quantité de fer apportée dans ces pathologies est basée sur des essais cliniques qui ne prennent en compte que, d'une part, le taux de fer plasmatique, qui correspond aux apports possibles aux cellules, et d'autre part, la ferritine plasmatique qui témoigne des réserves disponibles mais n'est pas exempte d'interférences. Ce sont ces deux paramètres qui sont utilisés pour le suivi et l'adaptation posologique car il faut éviter la toxicité qu'induirait une surcharge en fer. La prise en compte de la corrélation apport/comportement cellulaire, tel qu'abordé ici, pourrait permettre une meilleure adaptation du schéma posologique de la supplémentation en optimisant le but recherché (besoin physiologique) et en diminuant les effets potentiellement délétères.

4. QUELQUES DIFFERENCES DE GESTION DU FER QUI REFLETENT UN DESTIN CELLULAIRE DIFFERENT AU SEIN DES MODELES CELLULAIRES LEUCEMIQUES

Les profils transcriptionnels des nœuds du réseau fer sont globalement similaires entre les deux lignées étudiées lors de leur phase de prolifération. Les différences observées portent sur les transcrits ALAS2 et FPN1 présents uniquement chez K562 avec d'autres transcrits comme EpoR et les globines $\alpha/\beta/\gamma$ démontrant un engagement précoce de K562 vers la lignée érythroïde. Ceci est à mettre en relation avec un taux de transcrit des sous-unités ferritine et de récepteur de la transferrine supérieur chez K562, suggérant un besoin plus important en fer que la lignée KG1. La mesure du seuil de fer nécessaire à la survie et la prolifération corrobore cette hypothèse car supérieur à chacun des autres types cellulaires étudiées, dont KG1. Il est toutefois surprenant d'observer que c'est K562 et non KG1 qui exprime les transcrits codant l'exporteur de fer (FPN1). Nous n'avons cependant pas été en mesure de vérifier la présence ou l'absence de la protéine correspondante.

Ce besoin accru de fer pour K562 se confirme par notre quantification absolue de la ferritine par western blot à l'aide d'une gamme de protéine purifiée donnant à partir de 8 mesures indépendantes une concentration comprise entre 10 et 540 nM. Cette capacité de stockage et les besoins en fer de K562 sont à mettre en relation avec sa vitesse de doublement relativement courte (environ 24h) et sa tendance vers l'engagement érythrocytaire avec les caractéristiques associées. En effet, la lignée K562 est caractérisée par un état de pré-synthèse d'hémoglobine (fœtale majoritairement) par la présence des ARNm codant les globines sans synthèse marquée de la protéine excepté en cas d'utilisation d'un inducteur comme l'hémine (non pratiqué dans nos expériences) (*Charnay and Maniatis, 1983*), ou lors de culture sur le long terme pouvant provoquer une différenciation spontanée avec notamment des érythrocytes producteurs d'Hb F ou B (*Lozzio et al., 1981*). K562 doit donc avoir la capacité de moduler l'effet homéostatique des IRP. Ceci est à mettre en relation, d'une part, avec la capacité proliférative supérieure des K562 et, d'autre part, avec une sensibilité plus accrue des cellules K562 notamment à la carence. En effet, ces cellules K562 présentent un nombre de cellules plus important en phase S du cycle cellulaire, un blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1 plus facile à

obtenir qu'avec les KG1 et après carence une mortalité cellulaire plus forte ainsi qu'une diminution plus importante de la concentration intra-cellulaire totale en fer (réduit d'un facteur 3 pour KG1 et d'un facteur 4 pour K562).

Ainsi, bien que pour les deux lignées une carence efficace soit caractérisée par une diminution de seulement la moitié de la ferritine, la forme de stockage du fer, dans la très large majorité des cas cette diminution est suffisante pour stopper la croissance des K562 et même induire une mort par apoptose pour une partie des cellules, alors que souvent, pour KG1 cette diminution est insuffisante pour déclencher immédiatement l'apoptose. Cela confirme le rôle crucial du fer dans le destin cellulaire, notamment dans l'arrêt de la croissance des cellules initiatrices et une gestion du fer quelque peu différente entre les lignées avec une dépendance plus forte vis à vis du fer de K562, alors que KG1 est capable de croître avec de moindres concentrations de fer ce qui suppose une utilisation maximale des ressources intra-cellulaires et donc une meilleure gestion du fer intra-cellulaire. L'incapacité des cellules KG1 à exporter le fer jugée par l'absence de détection de transcrits FPN1 est un argument supplémentaire en faveur d'une diminution du flux de fer et d'une régulation plus stricte de son entrée.

Cependant malgré les arguments énoncés ci-dessus, nos résultats démontrent une activité IRP identique en phase de prolifération et une augmentation identique de l'activité IRP après déplétion en fer pour les deux modèles cellulaires. Cela suggère qu'une gestion du fer différente entre les deux lignées est compatible avec un état similaire du système IRE-IRP. Une hypothèse de la gestion cellulaire du fer au sein de ces cellules correspondrait à un système IRE-IRP fonctionnel mais dépassé en étant non modulé par la concentration en fer, comme démontré dans les érythroblastes murins dans un état terminal de différenciation (*Schranzhofer et al., 2006*). Cette situation qui va à l'encontre du fonctionnement standard du système IRE-IRP, et permet un afflux massif de fer, pourrait être bénéfique aux cellules leucémiques cherchant à maximiser leur apport en fer pour proliférer. Or, comme nous l'avons démontré précédemment le système IRE-IRP des K562 est parfaitement fonctionnel, sous la dépendance de la concentration en fer dont le seuil permettant l'activation des IRP a été déterminée, ce qui exclut une telle possibilité.

Discussion et perspectives

Les transcrits annexes au système régulateur, mais jouant un rôle à part entière dans l'homéostasie du fer, reflètent aussi bien l'origine des cellules étudiées que leur devenir avec au sein de cette immaturité globale la présence de signes de stades de différenciation différents. On peut ainsi faire deux remarques lorsqu'on compare l'ensemble des profils transcriptionnels. Premièrement, les cellules CD34⁺ témoins (progéniteurs de sang de cordon ou progéniteurs périphériques mobilisés) et cellules leucémiques de patients semblent plus engagées vers la lignée érythrocytaire avec un rapprochement de la lignée K562 par la présence des transcrits des globines, du récepteur de l'EPO, et d'ALAS2. La variation toutefois des quantités respectives des trois globines traduit la variation d'immaturité avec les cellules K562 et de sang de cordon plus immatures que les cellules progénitrices périphériques ou leucémiques pour lesquels la gamma globine est minoritaire en comparaison des deux autres formes. Ces résultats ne signifient pas pour autant que ces cellules sont, ou seront des cellules érythroïdes, mais qu'elles ont la propension pour un engagement vers la lignée des globules rouges. Aucun transcrit spécifique à un engagement vers les lignées lymphoïde, monocyttaire ou mégacaryocytaire n'a été étudié, ce qui n'exclut pas que de tels transcrits soient aussi présents.

Ensuite, la différence d'expression d'HILPDA reflète l'origine de ces cellules. A la limite de la détection pour les cellules progénitrices périphériques mobilisées, cela suggère l'absence d'activation du facteur de transcription HIF-1 α et donc c'est un argument pour une situation moins hypoxique par rapport aux lignées cellulaires ou cellules primaires de patient. A contrario, les cellules progénitrices de sang de cordon avec un taux d'HILPDA proche des transcrits de référence serait soumises à la plus hypoxique des situations parmi l'ensemble des cellules étudiées. Quant aux variations du transcrit HMOX-1, témoin d'une réponse à un stress oxydant, elles suggèrent que les cellules progénitrices témoins (sang de cordon) et leucémiques, contrairement aux lignées pour lesquelles le transcrit est très peu présent, sont plus en situation de réponse à un tel stress. Cela conforte les résultats de mesure de stress oxydant précédemment décrits et pose le problème du biais et de la limite de la culture *in vitro* de ces cellules sous 20% d'oxygène.

Ces deux lignées, avec leur discret décalage de stade de maturation et d'engagement, ne montrent pas une gestion du flux de fer sensiblement affectée.

5. CONSERVATION DU SYSTEME IRE-IRP ENTRE CELLULES SAINES ET MALIGNES

La comparaison des profils des ARNm de lignées proliférantes, ainsi que ceux des patients atteints de leucémie aigues myéloïde, à celui de cellules progénitrices témoins issues de sang de cordon, montre une similitude transcriptionnelle des messagers du système IRE-IRP étudiés. Ces données indiquent donc une distribution des cibles du système IRP très proche entre progéniteurs sains et leucémiques.

In vitro des variations d'expression des transcrits IRP 1 et IRP2 ont été décrites lors de l'induction de la différenciation de progéniteurs hématopoïétiques, avec une expression permanente de l'ARNm d'IRP2 et une perte d'expression de l'ARNm d'IRP 1 au cours des premières étapes de la différenciation myéloïde, mais pas dans la différenciation érythroïde où les deux IRP jouent un rôle (Schranzhofer et al., 2006; Sposi et al., 2000). Des variations de l'ensemble des transcrits intervenants dans le système régulateur IRE-IRP sont donc susceptibles d'être rencontrés selon l'évolution que subissent ces cellules. Or, nous montrons ici qu'à travers la similitude observée des profils, cellules leucémiques comme cellules progénitrices partagent bien un même état d'immaturité pour lequel les éléments régulés du système IRE-IRP sont en phase.

L'activation de ce système montre cependant des différences entre cellules saines et malignes. L'activité IRP mesurée pour chaque patient se révèle supérieure à l'activité IRP des cellules de sang de cordon et de moelle osseuse de témoins sains avec une forte amplitude de variations de ces activités (entre x1.5 et x4). Mais de façon surprenante, aucune variation significative de la quantité de ferritine et du récepteur de la transferrine n'est perceptible. L'absence de différence de quantité d'ARNm TfRC entre les deux types cellulaires corrobore cette observation. Ce qui signifie que malgré l'état de sur-activation du système régulateur IRP, la régulation ne s'exerce pas sur les cibles IRE quantitativement les plus importantes de l'ensemble des cibles IRE connues à ce jour. Cette absence supposée de régulation effective des IRP actifs, non démontré par des expérimentations identiques à celles faites *in cellulo* sur les lignées, réside peut être dans l'observation faite par Western blot de la dégradation massive de la protéine IRP1, dégradation non détectée lors de l'analyse

sur les lignées cellulaires. Peut être es-ce lié à une importante activité protéolytique au sein de ces cellules, induisant un turnover important d'IRP1, ou encore plus hypothétique, cela peut être perçu comme un mécanisme d'adaptation de la cellule afin de se soustraire à la régulation exercée par le système IRP. Dans de telles situations l'accroissement de l'activité observée par rapport à des cellules non malignes correspondrait à une tentative de compensation de la perte globale d'IRP.

Pour les cellules progénitrices saines comme pour les progéniteurs leucémiques, selon nos résultats, cette activité du système régulateur IRE-IRP est principalement médiée par l'IRP1, l'activité d'IRP2 étant non détectable, tout comme la présence de la protéine dans les types cellulaires étudiées. Cependant son transcrit étant quantifiable, tout laisse supposer que si la protéine est exprimée, celle-ci est très majoritairement dégradée par les systèmes protéolytiques précédemment décrits (Dycke et al., 2008; Guo et al., 1995b; Vashisht et al., 2009). L'absence d'activité conséquent d'IRP2 pourrait être une caractéristique des cellules progénitrices immatures indifférenciés, conservée au cours de la transformation leucémique, car comme l'ont montré Sposi et al. lors de la différenciation des cellules érythroïdes, des variations de la quantité des ARN messagers des IRP (principalement d'IRP1) sont mis en évidence. Cela suppose que l'expression protéique des IRP suit la quantité d'ARNm de ces derniers en l'absence de mécanismes régulateurs identifiés à ce jour. Dans ces mêmes travaux, les cellules progénitrices hématopoïétiques (obtenues par sélection négative et non positive comme dans nos travaux) issues de sang périphérique révèlent un très faible niveau de transcrits pour les deux IRP, ce que nos mesures de RT-qPCR confirment.

Ces résultats sont également à considérer selon la pression partielle en oxygène (pO_2) à laquelle ont été soumis les échantillons analysés. En effet, si dans les cellules primaires de patients traitées directement *ex-vivo* (sans étape de culture), on ne semble pas avoir une régulation en lien avec l'activité IRP, c'est peut-être qu'à l'image des modèles murins (Cooperman et al., 2005; Galy et al., 2005; LaVaute et al., 2001), IRP1 ne compense pas le défaut d'IRP2. Ce résultat n'est pas valable *in vitro* pour les cultures de lignées cellulaires en condition de normoxie, pour laquelle Meyron-Holtz et al. démontrent la compensation par IRP1. L'absence d'IRP2 pourrait également être en lien avec la pO_2 . En effet IRP2 est dominant lors de conditions

hypoxiques (*Meyron-Holtz et al., 2004b*), or les progéniteurs de sang de cordon que ce soit dans le cordon ou en culture sont soumis à une concentration d'oxygène élevée. Si cela était vérifié, cela pourrait faire de l'absence d'IRP2 dans les blastes une anomalie caractéristique. Des expérimentations en condition hypoxique et de la répression des gènes codant les IRP pourraient avoir leur intérêt pour comprendre les spécificités de la régulation par le système IRE-IRP dans les cellules leucémiques.

En somme, nos données soulignent les faibles besoins en fer des progéniteurs hématopoïétiques, et d'autres cellules, pour proliférer. Dans les lignées cellulaires, le régulateur IRP est en excès par rapport à ses cibles IRE, ce qui pourrait être une caractéristique générale du contrôle de la traduction pour des ARNm spécifiques par fixation de régulateurs translationnels. La régulation semble exclusivement le fait d'IRP1, puisqu' IRP2 n'a pas été détecté dans les progéniteurs hématopoïétiques, qu'ils soient pathologiques ou non. De subtiles différences ont été identifiées dans les quantités des composants du réseau gérant le fer dans les cellules leucémiques en comparaison des cellules saines témoins, ainsi que des capacités différentes à croître dans un milieu minimal comportant des concentrations en fer précisément définies.

Les informations obtenues à travers ce travail pourraient bénéficier à l'élaboration de protocoles thérapeutiques, incluant notamment la manipulation du fer, dans les LAM ou d'autres pathologies.

Références

---- *A* ----

Abboud, S., and Haile, D.J. (2000). A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *The Journal of biological chemistry* 275, 19906-19912.

Abdel-Wahab, O., and Levine, R.L. (2010). Metabolism and the leukemic stem cell. *The Journal of experimental medicine* 207, 677-680.

Aguilar-Martinez, P., Schved, J.F., and Brissot, P. (2005). The evaluation of hyperferritinemia: an updated strategy based on advances in detecting genetic abnormalities. *The American journal of gastroenterology* 100, 1185-1194.

Anderson, G.J., Frazer, D.M., and McLaren, G.D. (2009). Iron absorption and metabolism. *Current opinion in gastroenterology* 25, 129-135.

Anderson, S.A., Nizzi, C.P., Chang, Y.I., Deck, K.M., Schmidt, P.J., Galy, B., Damernsawad, A., Broman, A.T., Kendzioriski, C., Hentze, M.W., et al. (2013). The IRP1-HIF-2alpha axis coordinates iron and oxygen sensing with erythropoiesis and iron absorption. *Cell metabolism* 17, 282-290.

Andrews, P.A. (1999). The care of patients undergoing hemodialysis. *The New England journal of medicine* 340, 735; author reply 736-737.

---- *B* ----

Bacher, U., Haferlach, T., Schoch, C., Kern, W., and Schnittger, S. (2006). Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood* 107, 3847-3853.

Bacher, U., Schnittger, S., and Haferlach, T. (2010). Molecular genetics in acute myeloid leukemia. *Current opinion in oncology* 22, 646-655.

Baldus, C.D., and Bullinger, L. (2008). Gene expression with prognostic implications in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Seminars in oncology* 35, 356-364.

Barton, H.A., Eisenstein, R.S., Bomford, A., and Munro, H.N. (1990). Determinants of the interaction between the iron-responsive element-binding protein and its binding site in rat L-ferritin mRNA. *J Biol Chem* 265, 7000-7008.

Bekri, S., May, A., Cotter, P.D., Al-Sabah, A.I., Guo, X., Masters, G.S., and Bishop, D.F. (2003). A promoter mutation in the erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase (ALAS2) gene causes X-linked sideroblastic anemia. *Blood* 102, 698-704.

Références

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British journal of haematology* 33, 451-458.

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1985). Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of internal medicine* 103, 620-625.

Berman, E., Heller, G., Santorsa, J., McKenzie, S., Gee, T., Kempin, S., Gulati, S., Andreeff, M., Kolitz, J., Gabrilove, J., et al. (1991). Results of a randomized trial comparing idarubicin and cytosine arabinoside with daunorubicin and cytosine arabinoside in adult patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia. *Blood* 77, 1666-1674.

Bomford, A., Conlon-Hollingshead, C., and Munro, H.N. (1981). Adaptive responses of rat tissue isoferritins to iron administration. Changes in subunit synthesis, isoferritin abundance, and capacity for iron storage. *The Journal of biological chemistry* 256, 948-955.

Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* 3, 730-737.

Brazzolotto, X., Gaillard, J., Pantopoulos, K., Hentze, M.W., and Moulis, J.M. (1999). Human cytoplasmic aconitase (Iron regulatory protein 1) is converted into its [3Fe-4S] form by hydrogen peroxide in vitro but is not activated for iron-responsive element binding. *The Journal of biological chemistry* 274, 21625-21630.

Breuer, W., Shvartsman, M., and Cabantchik, Z.I. (2008). Intracellular labile iron. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40, 350-354.

Butt, J., Kim, H.Y., Basilion, J.P., Cohen, S., Iwai, K., Philpott, C.C., Altschul, S., Klausner, R.D., and Rouault, T.A. (1996). Differences in the RNA binding sites of iron regulatory proteins and potential target diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 4345-4349.

---- C ----

Cabantchik, Z.I., Kakhlon, O., Epsztejn, S., Zanninelli, G., and Breuer, W. (2002). Intracellular and extracellular labile iron pools. *Advances in experimental medicine and biology* 509, 55-75.

Caligiuri, M.A., Briesewitz, R., Yu, J., Wang, L., Wei, M., Arnoczky, K.J., Marburger, T.B., Wen, J., Perrotti, D., Bloomfield, C.D., et al. (2007). Novel c-CBL and CBL-b ubiquitin ligase mutations in human acute myeloid leukemia. *Blood* 110, 1022-1024.

Callens, C., Coulon, S., Naudin, J., Radford-Weiss, I., Boissel, N., Raffoux, E., Wang, P.H., Agarwal, S., Tamouza, H., Paubelle, E., et al. (2010). Targeting iron homeostasis

Références

induces cellular differentiation and synergizes with differentiating agents in acute myeloid leukemia. *The Journal of experimental medicine* 207, 731-750.

Carter, K.P., Young, A.M., and Palmer, A.E. (2014). Fluorescent sensors for measuring metal ions in living systems. *Chemical reviews* 114, 4564-4601.

Casarrubea, D., Viatte, L., Hallas, T., Vasanthakumar, A., Eisenstein, R.S., Schumann, K., Hentze, M.W., and Galy, B. (2013). Abnormal body iron distribution and erythropoiesis in a novel mouse model with inducible gain of iron regulatory protein (IRP)-1 function. *J Mol Med (Berl)* 91, 871-881.

Casey, J.L., Hentze, M.W., Koeller, D.M., Caughman, S.W., Rouault, T.A., Klausner, R.D., and Harford, J.B. (1988). Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science (New York, NY)* 240, 924-928.

Casey, J.L., Koeller, D.M., Ramin, V.C., Klausner, R.D., and Harford, J.B. (1989). Iron regulation of transferrin receptor mRNA levels requires iron-responsive elements and a rapid turnover determinant in the 3' untranslated region of the mRNA. *The EMBO journal* 8, 3693-3699.

Cazzola, M., Bergamaschi, G., Dezza, L., and Arosio, P. (1990). Manipulations of cellular iron metabolism for modulating normal and malignant cell proliferation: achievements and prospects. *Blood* 75, 1903-1919.

Cazzola, M., Bergamaschi, G., Tonon, L., Arbustini, E., Grasso, M., Vercesi, E., Barosi, G., Bianchi, P.E., Cairo, G., and Arosio, P. (1997). Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome: relationship between phenotypes and specific mutations in the iron-responsive element of ferritin light-chain mRNA. *Blood* 90, 814-821.

Chan, W.I., and Huntly, B.J. (2008). Leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Seminars in oncology* 35, 326-335.

Charnay, P., and Maniatis, T. (1983). Transcriptional regulation of globin gene expression in the human erythroid cell line K562. *Science (New York, NY)* 220, 1281-1283.

Chaston, T.B., Watts, R.N., Yuan, J., and Richardson, D.R. (2004). Potent antitumor activity of novel iron chelators derived from di-2-pyridylketone isonicotinoyl hydrazone involves fenton-derived free radical generation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 7365-7374.

Chaudhary, P., and Pullarkat, V. (2013). Deferasirox: appraisal of safety and efficacy in long-term therapy. *Journal of blood medicine* 4, 101-110.

Chen, G., Fillebeen, C., Wang, J., and Pantopoulos, K. (2007). Overexpression of iron regulatory protein 1 suppresses growth of tumor xenografts. *Carcinogenesis* 28, 785-791.

Cheson, B.D., Bennett, J.M., Kopecky, K.J., Buchner, T., Willman, C.L., Estey, E.H., Schiffer, C.A., Doehner, H., Tallman, M.S., Lister, T.A., et al. (2003). Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of

Références

Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21, 4642-4649.

Christiansen, D.H., Andersen, M.K., and Pedersen-Bjergaard, J. (2001). Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 19, 1405-1413.

Cianetti, L., Segnalini, P., Calzolari, A., Morsilli, O., Felicetti, F., Ramoni, C., Gabbianelli, M., Testa, U., and Sposi, N.M. (2005). Expression of alternative transcripts of ferroportin-1 during human erythroid differentiation. *Haematologica* 90, 1595-1606.

Conway O'Brien, E., Prideaux, S., and Chevassut, T. (2014). The epigenetic landscape of acute myeloid leukemia. *Advances in hematology* 2014, 103175.

Cook, J.D., and Lynch, S.R. (1986). The liabilities of iron deficiency. *Blood* 68, 803-809.

Cooperman, S.S., Meyron-Holtz, E.G., Olivierre-Wilson, H., Ghosh, M.C., McConnell, J.P., and Rouault, T.A. (2005). Microcytic anemia, erythropoietic protoporphyria, and neurodegeneration in mice with targeted deletion of iron-regulatory protein 2. *Blood* 106, 1084-1091.

Costello, J.F., and Plass, C. (2001). Methylation matters. *Journal of medical genetics* 38, 285-303.

Cotruvo, J.A., and Stubbe, J. (2011). Class I ribonucleotide reductases: metallocofactor assembly and repair in vitro and in vivo. *Annual review of biochemistry* 80, 733-767.

Cozzio, A., Passegue, E., Ayton, P.M., Karsunky, H., Cleary, M.L., and Weissman, I.L. (2003). Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes & development* 17, 3029-3035.

---- *D* ----

Daniels, T.R., Bernabeu, E., Rodriguez, J.A., Patel, S., Kozman, M., Chiappetta, D.A., Holler, E., Ljubimova, J.Y., Helguera, G., and Penichet, M.L. (2012). The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1820, 291-317.

Di Croce, L., Raker, V.A., Corsaro, M., Fazi, F., Fanelli, M., Faretta, M., Fuks, F., Lo Coco, F., Kouzarides, T., Nervi, C., *et al.* (2002). Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science (New York, NY)* 295, 1079-1082.

Références

Dohner, H., Estey, E.H., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Buchner, T., Burnett, A.K., Dombret, H., Fenaux, P., Grimwade, D., Larson, R.A., et al. (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 115, 453-474.

Dorrance, A.M., Liu, S., Yuan, W., Becknell, B., Arnoczky, K.J., Guimond, M., Strout, M.P., Feng, L., Nakamura, T., Yu, L., et al. (2006). Mll partial tandem duplication induces aberrant Hox expression in vivo via specific epigenetic alterations. *The Journal of clinical investigation* 116, 2707-2716.

Dupuy, J., Volbeda, A., Carpentier, P., Darnault, C., Moulis, J.M., and Fontecilla-Camps, J.C. (2006). Crystal structure of human iron regulatory protein 1 as cytosolic aconitase. *Structure (London, England : 1993)* 14, 129-139.

Dycke, C., Bougault, C., Gaillard, J., Andrieu, J.P., Pantopoulos, K., and Moulis, J.M. (2007). Human iron regulatory protein 2 is easily cleaved in its specific domain: consequences for the haem binding properties of the protein. *The Biochemical journal* 408, 429-439.

Dycke, C., Charbonnier, P., Pantopoulos, K., and Moulis, J.M. (2008). A role for lysosomes in the turnover of human iron regulatory protein 2. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40, 2826-2832.

---- *E* ----

Eliasson, P., and Jonsson, J.I. (2010). The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *Journal of cellular physiology* 222, 17-22.

Eppert, K., Takenaka, K., Lechman, E.R., Waldron, L., Nilsson, B., van Galen, P., Metzeler, K.H., Poepl, A., Ling, V., Beyene, J., et al. (2011). Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nature medicine* 17, 1086-1093.

Epsztejn, S., Kakhlon, O., Glickstein, H., Breuer, W., and Cabantchik, I. (1997). Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Analytical biochemistry* 248, 31-40.

---- *F* ----

Falini, B., Nicoletti, I., Martelli, M.F., and Mecucci, C. (2007). Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood* 109, 874-885.

Ferecatu, I., Goncalves, S., Golinelli-Cohen, M.P., Clemancey, M., Martelli, A., Riquier, S., Guittet, E., Latour, J.M., Puccio, H., Drapier, J.C., et al. (2014). The diabetes drug target

Références

MitoNEET governs a novel trafficking pathway to rebuild an Fe-S cluster into cytosolic aconitase/iron regulatory protein 1. *J Biol Chem* 289, 28070-28086.

Ferrara, F., and Schiffer, C.A. (2013). Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet* 381, 484-495.

Figueroa, M.E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P.S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H.F., et al. (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer cell* 18, 553-567.

Frohling, S., Scholl, C., Bansal, D., and Huntly, B.J. (2007). HOX gene regulation in acute myeloid leukemia: CDX marks the spot? *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 6, 2241-2245.

---- *G* ----

Gale, R.E., Green, C., Allen, C., Mead, A.J., Burnett, A.K., Hills, R.K., and Linch, D.C. (2008). The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 111, 2776-2784.

Galy, B., Ferring, D., Minana, B., Bell, O., Janser, H.G., Muckenthaler, M., Schumann, K., and Hentze, M.W. (2005). Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient in iron regulatory protein 2 (IRP2). *Blood* 106, 2580-2589.

Gebauer, F., and Hentze, M.W. (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 827-835.

Gentles, A.J., Plevritis, S.K., Majeti, R., and Alizadeh, A.A. (2010). Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *Jama* 304, 2706-2715.

Ghosh, M.C., Zhang, D.L., Jeong, S.Y., Kovtunovych, G., Ollivierre-Wilson, H., Noguchi, A., Tu, T., Senecal, T., Robinson, G., Crooks, D.R., et al. (2013). Deletion of iron regulatory protein 1 causes polycythemia and pulmonary hypertension in mice through translational derepression of HIF2alpha. *Cell metabolism* 17, 271-281.

Ghoti, H., Fibach, E., Merkel, D., Perez-Avraham, G., Grisariu, S., and Rachmilewitz, E.A. (2010). Changes in parameters of oxidative stress and free iron biomarkers during treatment with deferasirox in iron-overloaded patients with myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 95, 1433-1434.

Gilliland, D.G., Jordan, C.T., and Felix, C.A. (2004). The molecular basis of leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*, 80-97.

Références

Gilreath, J.A., Stenehjem, D.D., and Rodgers, G.M. (2014). Diagnosis and treatment of cancer-related anemia. *American journal of hematology* 89, 203-212.

Gimm, T., Wiese, M., Teschemacher, B., Deggerich, A., Schodel, J., Knaup, K.X., Hackenbeck, T., Hellerbrand, C., Amann, K., Wiesener, M.S., et al. (2010). Hypoxia-inducible protein 2 is a novel lipid droplet protein and a specific target gene of hypoxia-inducible factor-1. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 4443-4458.

Ginzburg, Y., and Rivella, S. (2011). beta-thalassemia: a model for elucidating the dynamic regulation of ineffective erythropoiesis and iron metabolism. *Blood* 118, 4321-4330.

Goforth, J.B., Anderson, S.A., Nizzi, C.P., and Eisenstein, R.S. (2010). Multiple determinants within iron-responsive elements dictate iron regulatory protein binding and regulatory hierarchy. *RNA (New York, NY)* 16, 154-169.

Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, C., Harrison, G., Rees, J., Hann, I., Stevens, R., Burnett, A., et al. (1998). The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 92, 2322-2333.

Guan, Y., Gerhard, B., and Hogge, D.E. (2003). Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 101, 3142-3149.

Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L., and Hediger, M.A. (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388, 482-488.

Guo, B., Brown, F.M., Phillips, J.D., Yu, Y., and Leibold, E.A. (1995a). Characterization and expression of iron regulatory protein 2 (IRP2). Presence of multiple IRP2 transcripts regulated by intracellular iron levels. *J Biol Chem* 270, 16529-16535.

Guo, B., Phillips, J.D., Yu, Y., and Leibold, E.A. (1995b). Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *The Journal of biological chemistry* 270, 21645-21651.

Guo, B., Yu, Y., and Leibold, E.A. (1994). Iron regulates cytoplasmic levels of a novel iron-responsive element-binding protein without aconitase activity. *The Journal of biological chemistry* 269, 24252-24260.

Gutierrez, S.E., and Romero-Oliva, F.A. (2013). Epigenetic changes: a common theme in acute myelogenous leukemogenesis. *Journal of hematology & oncology* 6, 57.

Guzman, M.L., Neering, S.J., Upchurch, D., Grimes, B., Howard, D.S., Rizzieri, D.A., Luger, S.M., and Jordan, C.T. (2001). Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 98, 2301-2307.

Guzman, M.L., Rossi, R.M., Karnischky, L., Li, X., Peterson, D.R., Howard, D.S., and Jordan, C.T. (2005). The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood* 105, 4163-4169.

---- $\mathcal{H}$ ----

Haile, D.J., Hentze, M.W., Rouault, T.A., Harford, J.B., and Klausner, R.D. (1989). Regulation of interaction of the iron-responsive element binding protein with iron-responsive RNA elements. *Mol Cell Biol* 9, 5055-5061.

Haile, D.J., Rouault, T.A., Tang, C.K., Chin, J., Harford, J.B., and Klausner, R.D. (1992). Reciprocal control of RNA-binding and aconitase activity in the regulation of the iron-responsive element binding protein: role of the iron-sulfur cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 7536-7540.

Haines, D.D., Lekli, I., Teissier, P., Bak, I., and Tosaki, A. (2012). Role of haeme oxygenase-1 in resolution of oxidative stress-related pathologies: focus on cardiovascular, lung, neurological and kidney disorders. *Acta physiologica (Oxford, England)* 204, 487-501.

Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society transactions* 35, 1147-1150.

Hanson, E.S., Foot, L.M., and Leibold, E.A. (1999). Hypoxia post-translationally activates iron-regulatory protein 2. *The Journal of biological chemistry* 274, 5047-5052.

Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H.K., Vardiman, J., Lister, T.A., and Bloomfield, C.D. (1999). World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 17, 3835-3849.

Harrison, J.S., Rameshwar, P., Chang, V., and Bandari, P. (2002). Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood* 99, 394.

Hartmann, J., Brulke, F., Sinzig, U., Wulf, G., Maas, J.H., Konietzschke, F., and Haase, D. (2013). Iron overload impairs proliferation of erythroid progenitors cells (BFU-E) from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia research* 37, 327-332.

Henderson, B.R., Menotti, E., and Kuhn, L.C. (1996). Iron regulatory proteins 1 and 2 bind distinct sets of RNA target sequences. *The Journal of biological chemistry* 271, 4900-4908.

Henderson, R.J., Patton, S.M., and Connor, J.R. (2005). Development of a fluorescent reporter to assess iron regulatory protein activity in living cells. *Biochim Biophys Acta* 1743, 162-168.

Références

Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., and Andrews, N.C. (2004). Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* **117**, 285-297.

Hentze, M.W., and Preiss, T. (2010). The REM phase of gene regulation. *Trends Biochem Sci* **35**, 423-426.

Hentze, M.W., Rouault, T.A., Harford, J.B., and Klausner, R.D. (1989). Oxidation-reduction and the molecular mechanism of a regulatory RNA-protein interaction. *Science* **244**, 357-359.

Hider, R.C., and Kong, X. (2013a). Iron speciation in the cytosol: an overview. *Dalton transactions* (Cambridge, England : 2003) **42**, 3220-3229.

Hider, R.C., and Kong, X. (2013b). Iron: effect of overload and deficiency. *Metal ions in life sciences* **13**, 229-294.

Hole, P.S., Darley, R.L., and Tonks, A. (2011). Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias? *Blood* **117**, 5816-5826.

Hole, P.S., Pearn, L., Tonks, A.J., James, P.E., Burnett, A.K., Darley, R.L., and Tonks, A. (2010). Ras-induced reactive oxygen species promote growth factor-independent proliferation in human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* **115**, 1238-1246.

Hower, V., Mendes, P., Torti, F.M., Laubenbacher, R., Akman, S., Shulaev, V., and Torti, S.V. (2009). A general map of iron metabolism and tissue-specific subnetworks. *Molecular bioSystems* **5**, 422-443.

---- *I* ----

Ishitani, K., and Listowsky, I. (1975). Differences in subunit composition and iron content of isoferritins. *The Journal of biological chemistry* **250**, 5446-5449.

Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Matsuoka, S., Takubo, K., Hamaguchi, I., Nomiya, K., Hosokawa, K., Sakurada, K., Nakagata, N., *et al.* (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **431**, 997-1002.

Ito, S., Barrett, A.J., Dutra, A., Pak, E., Miner, S., Keyvanfar, K., Hensel, N.F., Rezvani, K., Muranski, P., Liu, P., *et al.* (2015). Long term maintenance of myeloid leukemic stem cells cultured with unrelated human mesenchymal stromal cells. *Stem cell research* **14**, 95-104.

Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., and Kaelin, W.G., Jr. (2001). HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* (New York, NY) **292**, 464-468.

---- J ----

Jang, Y.Y., and Sharkis, S.J. (2007). A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood* **110**, 3056-3063.

Jordan, C.T., and Guzman, M.L. (2004). Mechanisms controlling pathogenesis and survival of leukemic stem cells. *Oncogene* **23**, 7178-7187.

Joyce, A.R., and Palsson, B.O. (2006). The model organism as a system: integrating 'omics' data sets. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 198-210.

---- K ----

Kakhlon, O., and Cabantchik, Z.I. (2002). The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free radical biology & medicine* **33**, 1037-1046.

Kaplinsky, C., Estrov, Z., Freedman, M.H., Gelfand, E.W., and Cohen, A. (1987). Effect of deferoxamine on DNA synthesis, DNA repair, cell proliferation, and differentiation of HL-60 cells. *Leukemia* **1**, 437-441.

Ke, Y., Wu, J., Leibold, E.A., Walden, W.E., and Theil, E.C. (1998). Loops and bulge/loops in iron-responsive element isoforms influence iron regulatory protein binding. Fine-tuning of mRNA regulation? *The Journal of biological chemistry* **273**, 23637-23640.

Kikuchi, G., Yoshida, T., and Noguchi, M. (2005). Heme oxygenase and heme degradation. *Biochemical and biophysical research communications* **338**, 558-567.

Kohl, T.M., Schnittger, S., Ellwart, J.W., Hiddemann, W., and Spiekermann, K. (2005). KIT exon 8 mutations associated with core-binding factor (CBF)-acute myeloid leukemia (AML) cause hyperactivation of the receptor in response to stem cell factor. *Blood* **105**, 3319-3321.

Kornblau, S.M., Qutub, A., Yao, H., York, H., Qiu, Y.H., Graber, D., Ravandi, F., Cortes, J., Andreeff, M., Zhang, N., *et al.* (2013). Proteomic profiling identifies distinct protein patterns in acute myelogenous leukemia CD34+CD38- stem-like cells. *PloS one* **8**, e78453.

Krivtsov, A.V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M.C., Wang, Y., Faber, J., Levine, J.E., Wang, J., Hahn, W.C., Gilliland, D.G., *et al.* (2006). Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* **442**, 818-822.

Kundu, M., and Liu, P.P. (2001). Function of the inv(16) fusion gene CBFB-MYH11. *Current opinion in hematology* **8**, 201-205.



Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-648.

LaVaute, T., Smith, S., Cooperman, S., Iwai, K., Land, W., Meyron-Holtz, E., Drake, S.K., Miller, G., Abu-Asab, M., Tsokos, M., et al. (2001). Targeted deletion of the gene encoding iron regulatory protein-2 causes misregulation of iron metabolism and neurodegenerative disease in mice. *Nature genetics* 27, 209-214.

Le, N.T., and Richardson, D.R. (2002). The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochimica et biophysica acta* 1603, 31-46.

Leibold, E.A., and Munro, H.N. (1988). Cytoplasmic protein binds in vitro to a highly conserved sequence in the 5' untranslated region of ferritin heavy- and light-subunit mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 2171-2175.

Leidgens, S., Bullough, K.Z., Shi, H., Li, F., Shakoury-Elizeh, M., Yabe, T., Subramanian, P., Hsu, E., Natarajan, N., Nandal, A., et al. (2013). Each member of the poly-r(C)-binding protein 1 (PCBP) family exhibits iron chaperone activity toward ferritin. *The Journal of biological chemistry* 288, 17791-17802.

Leitch, H.A., Chan, C., Leger, C.S., Foltz, L.M., Ramadan, K.M., and Vickars, L.M. (2012). Improved survival with iron chelation therapy for red blood cell transfusion dependent lower IPSS risk MDS may be more significant in patients with a non-RARS diagnosis. *Leukemia research* 36, 1380-1386.

Lemmon, M.A., and Ferguson, K.M. (2007). A new twist in the transmembrane signaling tool-kit. *Cell* 130, 213-215.

Lemmon, M.A., Pinchasi, D., Zhou, M., Lax, I., and Schlessinger, J. (1997). Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor. *The Journal of biological chemistry* 272, 6311-6317.

Li, J.Y., Ram, G., Gast, K., Chen, X., Barasch, K., Mori, K., Schmidt-Ott, K., Wang, J., Kuo, H.C., Savage-Dunn, C., et al. (2004). Detection of intracellular iron by its regulatory effect. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C1547-1559.

Lipka, D.B., Wagner, M.C., Dziadosz, M., Schnoder, T., Heidel, F., Schemioneck, M., Melo, J.V., Kindler, T., Muller-Tidow, C., Koschmieder, S., et al. (2012). Intracellular retention of ABL kinase inhibitors determines commitment to apoptosis in CML cells. *PloS one* 7, e40853.

Références

Liu, S., Shen, T., Huynh, L., Klisovic, M.I., Rush, L.J., Ford, J.L., Yu, J., Becknell, B., Li, Y., Liu, C., et al. (2005a). Interplay of RUNX1/MTG8 and DNA methyltransferase 1 in acute myeloid leukemia. *Cancer research* 65, 1277-1284.

Liu, W., Shimomura, S., Imanishi, H., Iwamoto, Y., Ikeda, N., Saito, M., Ohno, M., Hara, N., Yamamoto, T., Nakamura, H., et al. (2005b). Hemochromatosis with mutation of the ferroportin 1 (IREG1) gene. *Internal medicine (Tokyo, Japan)* 44, 285-289.

Lok, C.N., and Ponka, P. (1999). Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *The Journal of biological chemistry* 274, 24147-24152.

Lok, C.N., and Ponka, P. (2000). Identification of an erythroid active element in the transferrin receptor gene. *The Journal of biological chemistry* 275, 24185-24190.

Losman, J.A., Looper, R.E., Koivunen, P., Lee, S., Schneider, R.K., McMahon, C., Cowley, G.S., Root, D.E., Ebert, B.L., and Kaelin, W.G., Jr. (2013). (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science (New York, NY)* 339, 1621-1625.

Lozzio, B.B., Lozzio, C.B., Bamberger, E.G., and Feliu, A.S. (1981). A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* 166, 546-550.

Lyons, R.M., Marek, B.J., Paley, C., Esposito, J., Garbo, L., DiBella, N., and Garcia-Manero, G. (2014). Comparison of 24-month outcomes in chelated and non-chelated lower-risk patients with myelodysplastic syndromes in a prospective registry. *Leukemia research* 38, 149-154.

---- *M* ----

Maffettone, C., Chen, G., Drozdov, I., Ouzounis, C., and Pantopoulos, K. (2010). Tumorigenic properties of iron regulatory protein 2 (IRP2) mediated by its specific 73-amino acids insert. *PloS one* 5, e10163.

Maier, T., Schmidt, A., Guell, M., Kuhner, S., Gavin, A.C., Aebersold, R., and Serrano, L. (2011). Quantification of mRNA and protein and integration with protein turnover in a bacterium. *Mol Syst Biol* 7, 511.

Marcucci, G., Haferlach, T., and Dohner, H. (2011). Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 475-486.

Maret, W. (2011). Metals on the move: zinc ions in cellular regulation and in the coordination dynamics of zinc proteins. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 24, 411-418.

Références

Martelli, A., and Moulis, J.M. (2004). Zinc and cadmium specifically interfere with RNA-binding activity of human iron regulatory protein 1. *Journal of inorganic biochemistry* 98, 1413-1420.

McLean, E., Cogswell, M., Egli, I., Wojdyla, D., and de Benoist, B. (2009). Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005. *Public health nutrition* 12, 444-454.

Merlot, A.M., Kalinowski, D.S., and Richardson, D.R. (2013). Novel chelators for cancer treatment: where are we now? *Antioxidants & redox signaling* 18, 973-1006.

Messa, E., Carturan, S., Maffe, C., Pautasso, M., Bracco, E., Roetto, A., Messa, F., Arruga, F., Defilippi, I., Rosso, V., et al. (2010). Deferasirox is a powerful NF-kappaB inhibitor in myelodysplastic cells and in leukemia cell lines acting independently from cell iron deprivation by chelation and reactive oxygen species scavenging. *Haematologica* 95, 1308-1316.

Meyron-Holtz, E.G., Ghosh, M.C., Iwai, K., LaVaute, T., Brazzolotto, X., Berger, U.V., Land, W., Ollivierre-Wilson, H., Grinberg, A., Love, P., et al. (2004a). Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *The EMBO journal* 23, 386-395.

Meyron-Holtz, E.G., Ghosh, M.C., and Rouault, T.A. (2004b). Mammalian tissue oxygen levels modulate iron-regulatory protein activities in vivo. *Science (New York, NY)* 306, 2087-2090.

Mobilia, N., Donzé, A., Moulis, J.-M., and Fanchon, E. (2012a). A Model of the Cellular Iron Homeostasis Network Using Semi-Formal Methods for Parameter Space Exploration. *EPTCS* 92, 42-57.

Mobilia, N., Donzé, A., Moulis, J.M., and Fanchon, E. (2012b). A Model of the Cellular Iron Homeostasis Network Using Semi-Formal Methods for Parameter Space Exploration. *EPTCS* 92, 42-57.

Mrozek, K. (2008). Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. *Seminars in oncology* 35, 365-377.

Mrozek, K., Heerema, N.A., and Bloomfield, C.D. (2004). Cytogenetics in acute leukemia. *Blood reviews* 18, 115-136.

Mrozek, K., Radmacher, M.D., Bloomfield, C.D., and Marcucci, G. (2009). Molecular signatures in acute myeloid leukemia. *Current opinion in hematology* 16, 64-69.

Muckenthaler, M., Gray, N.K., and Hentze, M.W. (1998). IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Mol Cell* 2, 383-388.

Références

Muckenthaler, M.U., Galy, B., and Hentze, M.W. (2008). Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annual review of nutrition* 28, 197-213.

Müllner, E.W., Neupert, B., and Kühn, L.C. (1989). A specific mRNA binding factor regulates the iron-dependent stability of cytoplasmic transferrin receptor mRNA. *Cell* 58, 373-382.

Murray, L.J., Young, J.C., Osborne, L.J., Luens, K.M., Scollay, R., and Hill, B.L. (1999). Thrombopoietin, flt3, and kit ligands together suppress apoptosis of human mobilized CD34+ cells and recruit primitive CD34+ Thy-1+ cells into rapid division. *Experimental hematology* 27, 1019-1028.

---- $\mathcal{N}$ ----

Nairz, M., Haschka, D., Demetz, E., and Weiss, G. (2014). Iron at the interface of immunity and infection. *Frontiers in pharmacology* 5, 152.

Nemeth, E., and Ganz, T. (2006). Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annual review of nutrition* 26, 323-342.

Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., Vaughn, M.B., Donovan, A., Ward, D.M., Ganz, T., and Kaplan, J. (2004). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science (New York, NY)* 306, 2090-2093.

Ning, Z.Q., Li, J., and Arceci, R.J. (2001a). Signal transducer and activator of transcription 3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit-mediated cytokine-independent survival and proliferation in human leukemia cells. *Blood* 97, 3559-3567.

Ning, Z.Q., Li, J., McGuinness, M., and Arceci, R.J. (2001b). STAT3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit induced tumorigenicity. *Oncogene* 20, 4528-4536.

Nurtjahja-Tjendraputra, E., Fu, D., Phang, J.M., and Richardson, D.R. (2007). Iron chelation regulates cyclin D1 expression via the proteasome: a link to iron deficiency-mediated growth suppression. *Blood* 109, 4045-4054.

---- $\mathcal{O}$ ----

Ohyashiki, J.H., Kobayashi, C., Hamamura, R., Okabe, S., Tauchi, T., and Ohyashiki, K. (2009). The oral iron chelator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemia cells by enhancing expression of REDD1. *Cancer science* 100, 970-977.

---- *P* ----

Pantopoulos, K., and Hentze, M.W. (1995). Rapid responses to oxidative stress mediated by iron regulatory protein. *The EMBO journal* 14, 2917-2924.

Patel, J.P., Gonen, M., Figueroa, M.E., Fernandez, H., Sun, Z., Racevskis, J., Van Vlierberghe, P., Dolgalev, I., Thomas, S., Aminova, O., et al. (2012). Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 366, 1079-1089.

Paubelle, E., Zylbersztejn, F., Alkhaeir, S., Suarez, F., Callens, C., Dussiot, M., Isnard, F., Rubio, M.T., Damaj, G., Gorin, N.C., et al. (2013). Deferasirox and vitamin D improves overall survival in elderly patients with acute myeloid leukemia after demethylating agents failure. *PloS one* 8, e65998.

Petrat, F., de Groot, H., Sustmann, R., and Rauen, U. (2002). The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *Biological chemistry* 383, 489-502.

Plass, C., Oakes, C., Blum, W., and Marcucci, G. (2008). Epigenetics in acute myeloid leukemia. *Seminars in oncology* 35, 378-387.

Ponka, P., and Lok, C.N. (1999). The transferrin receptor: role in health and disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 31, 1111-1137.

Pourcelot, E., Lenon, M., Mobilia, N., Cahn, J.Y., Arnaud, J., Fanchon, E., Moulis, J.M., and Mossuz, P. (2015). Iron for proliferation of cell lines and hematopoietic progenitors: Nailing down the intracellular functional iron concentration. *Biochim Biophys Acta* 1853, 1596-1605.

Pourcelot, E., Mobilia, N., Donzé, A., Louis, F., Maler, O., Mossuz, P., Fanchon, E., and Moulis, J.-M. (2013). Cellular iron regulation in animals: need and use of suitable models. In *Nutzen-Risiko-Bewertung von Mineralstoffen und Spurenelementen*, A. Hartwig, B. Köberle, and B. Michalke, eds. (Karlsruhe, Germany: KIT Scientific Publishing), pp. 73-89.

Pullarkat, V., Sehgal, A., Li, L., Meng, Z., Lin, A., Forman, S., and Bhatia, R. (2012). Deferasirox exposure induces reactive oxygen species and reduces growth and viability of myelodysplastic hematopoietic progenitors. *Leukemia research* 36, 966-973.

Pulte, D., Redaniel, M.T., Jansen, L., Brenner, H., and Jeffreys, M. (2013). Recent trends in survival of adult patients with acute leukemia: overall improvements, but persistent and partly increasing disparity in survival of patients from minority groups. *Haematologica* 98, 222-229.

Puntarulo, S. (2005). Iron, oxidative stress and human health. *Molecular aspects of medicine* 26, 299-312.

---- *R* ----

Recalcati, S., Alberghini, A., Campanella, A., Gianelli, U., De Camilli, E., Conte, D., and Cairo, G. (2006). Iron regulatory proteins 1 and 2 in human monocytes, macrophages and duodenum: expression and regulation in hereditary hemochromatosis and iron deficiency. *Haematologica* 91, 303-310.

Recalcati, S., Conte, D., and Cairo, G. (1999). Preferential activation of iron regulatory protein-2 in cell lines as a result of higher sensitivity to iron. *European journal of biochemistry / FEBS* 259, 304-309.

Recalcati, S., Minotti, G., and Cairo, G. (2010). Iron regulatory proteins: from molecular mechanisms to drug development. *Antioxidants & redox signaling* 13, 1593-1616.

Rocnik, J.L., Okabe, R., Yu, J.C., Lee, B.H., Giese, N., Schenkein, D.P., and Gilliland, D.G. (2006). Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD. *Blood* 108, 1339-1345.

Rogers, J.T., Randall, J.D., Cahill, C.M., Eder, P.S., Huang, X., Gunshin, H., Leiter, L., McPhee, J., Sarang, S.S., Utsuki, T., *et al.* (2002). An iron-responsive element type II in the 5'-untranslated region of the Alzheimer's amyloid precursor protein transcript. *The Journal of biological chemistry* 277, 45518-45528.

Rosenbauer, F., and Tenen, D.G. (2007). Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nature reviews Immunology* 7, 105-117.

Roth, M., Will, B., Simkin, G., Narayanagari, S., Barreyro, L., Bartholdy, B., Tamari, R., Mitsiades, C.S., Verma, A., and Steidl, U. (2012). Eltrombopag inhibits the proliferation of leukemia cells via reduction of intracellular iron and induction of differentiation. *Blood* 120, 386-394.

Rouault, T.A., Hentze, M.W., Caughman, S.W., Harford, J.B., and Klausner, R.D. (1988). Binding of a cytosolic protein to the iron-responsive element of human ferritin messenger RNA. *Science (New York, NY)* 241, 1207-1210.

Ruivard, M. (2013). [Iron chelating therapy in adults: How and when ?]. *La Revue de medecine interne / fondee par la Societe nationale francaise de medecine interne* 34, 32-38.

---- *S* ----

Sadlon, T.J., Dell'Oso, T., Surinya, K.H., and May, B.K. (1999). Regulation of erythroid 5-aminolevulinate synthase expression during erythropoiesis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 31, 1153-1167.

Références

Salahudeen, A.A., Thompson, J.W., Ruiz, J.C., Ma, H.W., Kinch, L.N., Li, Q., Grishin, N.V., and Bruick, R.K. (2009). An E3 ligase possessing an iron-responsive hemerythrin domain is a regulator of iron homeostasis. *Science (New York, NY)* 326, 722-726.

Sallmyr, A., Fan, J., Datta, K., Kim, K.T., Grosu, D., Shapiro, P., Small, D., and Rassool, F. (2008). Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood* 111, 3173-3182.

Samaniego, F., Chin, J., Iwai, K., Rouault, T.A., and Klausner, R.D. (1994). Molecular characterization of a second iron-responsive element binding protein, iron regulatory protein 2. Structure, function, and post-translational regulation. *J Biol Chem* 269, 30904-30910.

Sanchez, M., Galy, B., Dandekar, T., Bengert, P., Vainshtein, Y., Stolte, J., Muckenthaler, M.U., and Hentze, M.W. (2006). Iron regulation and the cell cycle: identification of an iron-responsive element in the 3'-untranslated region of human cell division cycle 14A mRNA by a refined microarray-based screening strategy. *The Journal of biological chemistry* 281, 22865-22874.

Sanchez, M., Galy, B., Muckenthaler, M.U., and Hentze, M.W. (2007). Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2alpha expression in iron deficiency. *Nature structural & molecular biology* 14, 420-426.

Sanchez, M., Galy, B., Schwanhaeusser, B., Blake, J., Bahr-Ivacevic, T., Benes, V., Selbach, M., Muckenthaler, M.U., and Hentze, M.W. (2011). Iron regulatory protein-1 and -2: transcriptome-wide definition of binding mRNAs and shaping of the cellular proteome by iron regulatory proteins. *Blood* 118, e168-179.

Schlenk, R.F., and Dohner, K. (2009). Impact of new prognostic markers in treatment decisions in acute myeloid leukemia. *Current opinion in hematology* 16, 98-104.

Schlenk, R.F., Dohner, K., Krauter, J., Frohling, S., Corbacioglu, A., Bullinger, L., Haddank, M., Spath, D., Morgan, M., Benner, A., *et al.* (2008). Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 358, 1909-1918.

Schneider, B.D., and Leibold, E.A. (2003). Effects of iron regulatory protein regulation on iron homeostasis during hypoxia. *Blood* 102, 3404-3411.

Schnittger, S., Schoch, C., Kern, W., Mecucci, C., Tschulik, C., Martelli, M.F., Haferlach, T., Hiddemann, W., and Falini, B. (2005). Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 106, 3733-3739.

Scholl, C., Gilliland, D.G., and Frohling, S. (2008). Deregulation of signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Seminars in oncology* 35, 336-345.

Références

Schranzhofer, M., Schifrer, M., Cabrera, J.A., Kopp, S., Chiba, P., Beug, H., and Mullner, E.W. (2006). Remodeling the regulation of iron metabolism during erythroid differentiation to ensure efficient heme biosynthesis. *Blood* 107, 4159-4167.

Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., and Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337-342.

Schwartz, S., Heinecke, A., Zimmermann, M., Creutzig, U., Schoch, C., Harbott, J., Fonatsch, C., Löffler, H., Buchner, T., Ludwig, W.D., et al. (1999). Expression of the C-kit receptor (CD117) is a feature of almost all subtypes of de novo acute myeloblastic leukemia (AML), including cytogenetically good-risk AML, and lacks prognostic significance. *Leukemia & lymphoma* 34, 85-94.

Shenoy, N., Vallumsetla, N., Rachmilewitz, E., Verma, A., and Ginzburg, Y. (2014). Impact of iron overload and potential benefit from iron chelation in low-risk myelodysplastic syndrome. *Blood* 124, 873-881.

Shi, H., Bencze, K.Z., Stemmler, T.L., and Philpott, C.C. (2008). A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science (New York, NY)* 320, 1207-1210.

Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology* 82, 291-295.

Simon, M., Grandage, V.L., Linch, D.C., and Khwaja, A. (2005). Constitutive activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. *Oncogene* 24, 2410-2420.

Smith, M., Barnett, M., Bassan, R., Gatta, G., Tondini, C., and Kern, W. (2004). Adult acute myeloid leukaemia. *Critical reviews in oncology/hematology* 50, 197-222.

Soum, E., Brazzolotto, X., Goussias, C., Bouton, C., Moulis, J.M., Mattioli, T.A., and Drapier, J.C. (2003). Peroxynitrite and nitric oxide differently target the iron-sulfur cluster and amino acid residues of human iron regulatory protein 1. *Biochemistry* 42, 7648-7654.

Sposi, N.M., Cianetti, L., Tritarelli, E., Pelosi, E., Militi, S., Barberi, T., Gabbianelli, M., Saulle, E., Kuhn, L., Peschle, C., et al. (2000). Mechanisms of differential transferrin receptor expression in normal hematopoiesis. *European journal of biochemistry / FEBS* 267, 6762-6774.

---- *T* ----

Taoka, K., Kumano, K., Nakamura, F., Hosoi, M., Goyama, S., Imai, Y., Hangaishi, A., and Kurokawa, M. (2012). The effect of iron overload and chelation on erythroid differentiation. *International journal of hematology* 95, 149-159.

Références

Taussig, D.C., Vargaftig, J., Miraki-Moud, F., Griessinger, E., Sharrock, K., Luke, T., Lillington, D., Oakervee, H., Cavenagh, J., Agrawal, S.G., et al. (2010). Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. *Blood* 115, 1976-1984.

Theil, E.C. (2015). IRE mRNA riboregulators use metabolic iron (Fe(2+)) to control mRNA activity and iron chemistry in animals. *Metallomics* 7, 15-24.

Thiede, C., Koch, S., Creutzig, E., Steudel, C., Illmer, T., Schaich, M., and Ehninger, G. (2006). Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 107, 4011-4020.

Thiede, C., Steudel, C., Mohr, B., Schaich, M., Schakel, U., Platzbecker, U., Wermke, M., Bornhauser, M., Ritter, M., Neubauer, A., et al. (2002). Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 99, 4326-4335.

Torti, S.V., and Torti, F.M. (2013). Iron and cancer: more ore to be mined. *Nature reviews Cancer* 13, 342-355.

Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B.J., Lee, B.H., Castrillon, D.H., Cullen, D.E., McDowell, E.P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I.R., Sears, C., et al. (2007). FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* 128, 325-339.

Tschan, M.P., Shan, D., Laedrach, J., Eyholzer, M., Leibundgut, E.O., Baerlocher, G.M., Tobler, A., Stroka, D., and Fey, M.F. (2010). NDRG1/2 expression is inhibited in primary acute myeloid leukemia. *Leukemia research* 34, 393-398.

----- $\mathcal{V}$ -----

van Gosliga, D., Schepers, H., Rizo, A., van der Kolk, D., Vellenga, E., and Schuringa, J.J. (2007). Establishing long-term cultures with self-renewing acute myeloid leukemia stem/progenitor cells. *Experimental hematology* 35, 1538-1549.

Van Meter, M.E., Diaz-Flores, E., Archard, J.A., Passegue, E., Irish, J.M., Kotecha, N., Nolan, G.P., Shannon, K., and Braun, B.S. (2007). K-RasG12D expression induces hyperproliferation and aberrant signaling in primary hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood* 109, 3945-3952.

Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellstrom-Lindberg, E., Tefferi, A., et al. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937-951.

Références

Vashisht, A.A., Zumbrennen, K.B., Huang, X., Powers, D.N., Durazo, A., Sun, D., Bhaskaran, N., Persson, A., Uhlen, M., Sangfelt, O., et al. (2009). Control of iron homeostasis by an iron-regulated ubiquitin ligase. *Science (New York, NY)* 326, 718-721.

Vogel, C., Abreu Rde, S., Ko, D., Le, S.Y., Shapiro, B.A., Burns, S.C., Sandhu, D., Boutz, D.R., Marcotte, E.M., and Penalva, L.O. (2010). Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line. *Mol Syst Biol* 6, 400.

Volz, K. (2008). The functional duality of iron regulatory protein 1. *Curr Opin Struct Biol* 18, 106-111.

---- $\mathcal{W}$ ----

Wallander, M.L., Leibold, E.A., and Eisenstein, R.S. (2006). Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1763, 668-689.

Wang, J., Chen, G., and Pantopoulos, K. (2005). Inhibition of transferrin receptor 1 transcription by a cell density response element. *The Biochemical journal* 392, 383-388.

Wang, J., and Pantopoulos, K. (2011). Regulation of cellular iron metabolism. *The Biochemical journal* 434, 365-381.

Wang, W., Di, X., D'Agostino, R.B., Jr., Torti, S.V., and Torti, F.M. (2007). Excess capacity of the iron regulatory protein system. *The Journal of biological chemistry* 282, 24650-24659.

Wiernik, P.H., Banks, P.L., Case, D.C., Jr., Arlin, Z.A., Periman, P.O., Todd, M.B., Ritch, P.S., Enck, R.E., and Weitberg, A.B. (1992). Cytarabine plus idarubicin or daunorubicin as induction and consolidation therapy for previously untreated adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 79, 313-319.

Wilkinson, N., and Pantopoulos, K. (2013). IRP1 regulates erythropoiesis and systemic iron homeostasis by controlling HIF2 α mRNA translation. *Blood* 122, 1658-1668.

Wingert, R.A., Galloway, J.L., Barut, B., Foott, H., Fraenkel, P., Axe, J.L., Weber, G.J., Dooley, K., Davidson, A.J., Schmid, B., et al. (2005). Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* 436, 1035-1039.

---- $\mathcal{Y}$ ----

Yamamoto, Y., Kiyoi, H., Nakano, Y., Suzuki, R., Kodera, Y., Miyawaki, S., Asou, N., Kuriyama, K., Yagasaki, F., Shimazaki, C., et al. (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 97, 2434-2439.

Références

Yu, Y., Kovacevic, Z., and Richardson, D.R. (2007). Tuning cell cycle regulation with an iron key. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 6, 1982-1994.

----- Z -----

Zhang, D.L., Ghosh, M.C., and Rouault, T.A. (2014). The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis - an update. *Front Pharmacol* 5, 124.

Zhang, F., Wang, W., Tsuji, Y., Torti, S.V., and Torti, F.M. (2008). Post-transcriptional modulation of iron homeostasis during p53-dependent growth arrest. *The Journal of biological chemistry* 283, 33911-33918.

Zheng, R., Levis, M., Piloto, O., Brown, P., Baldwin, B.R., Gorin, N.C., Beran, M., Zhu, Z., Ludwig, D., Hicklin, D., et al. (2004). FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells. *Blood* 103, 267-274.

Zhou, F.L., Zhang, W.G., Wei, Y.C., Meng, S., Bai, G.G., Wang, B.Y., Yang, H.Y., Tian, W., Meng, X., Zhang, H., et al. (2010). Involvement of oxidative stress in the relapse of acute myeloid leukemia. *The Journal of biological chemistry* 285, 15010-15015.

Zon, L.I. (2008). Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal. *Nature* 453, 306-313.

Zumbrennen, K.B., Wallander, M.L., Romney, S.J., and Leibold, E.A. (2009). Cysteine oxidation regulates the RNA-binding activity of iron regulatory protein 2. *Molecular and cellular biology* 29, 2219-2229.

RESUME

Iron cellular homeostasis in myeloid leukemic cells

Use of iron resources and variations of the redox balance are processes involved in cell proliferation and differentiation. They participate to normal hematopoiesis and their disturbance may be associated with pathological conditions. Hematological neoplasms, such as acute myeloid leukemia (AML), provide clinical evidence of the link between iron availability, redox signaling, and malignancy. Stringent iron depletion induces arrest of proliferation followed by cell death, and deprived primary leukemic cells of AML patients (blasts) have been previously shown to engage into the monocytic lineage. Yet, the iron needs of leukemic clones are unknown. The core network of cellular iron regulation in mammals is organized around the IRE-IRP system. The Iron Regulatory Proteins (IRP) act on the translation of many proteins involved in iron management by interacting with Iron Responsive Elements (IRE) located on the untranslated regions of messenger RNA (mRNA) coding these proteins.

Using leukemic cell lines (KG1, K562), blasts of AML patients and CD34⁺ progenitors isolated from cord blood or the bone marrow of healthy donors, the status of the iron management system was established in the first stages of normal and pathological hematopoiesis. The response of the homeostatic system upon manipulation of iron provision, including with clinically implemented chelators, has been monitored.

Our data emphasize the weak iron requirements of hematopoietic progenitors, and other cells, to proliferate. In cell lines the IRP regulator is in excess of its IRE targets, which may be a general feature of translational control for specific mRNA. The regulation seems exclusively mediated by IRP1, as the IRP2 regulator has not been detected in normal or malignant hematopoietic progenitors. Subtle differences have been found in the iron handling system of leukemic cells as compared to normal cells, together with different abilities to grow on a minimal medium containing precisely defined iron concentrations.

The design of improved therapeutic regimens including iron manipulation, in AML and other pathologies, may benefit from considering the information obtained in this work.

Keywords: Iron homeostasis, acute Myeloid Leukemia, translational regulation, iron regulatory proteins, iron responsive element, cellular growth, differentiation.

ABSTRACT

Homéostasie cellulaire du fer dans les cellules leucémiques myéloïdes

L'utilisation des ressources en fer et les variations du potentiel redox sont des processus impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Ils participent à l'hématopoïèse normale et leur dérégulation peut être associée à des conditions pathologiques. Les hémopathies, telles que la leucémie aiguë myéloïde (LAM), témoignent du lien entre disponibilité en fer, signalisation redox et leucémogénèse. La déplétion en fer induit un arrêt de la prolifération suivi de la mort cellulaire, et pour des cellules primaires leucémiques (blastes) de patients LAM, elle peut conduire à un réengagement de la différenciation vers la lignée monocyttaire. Cependant, les besoins en fer des clones leucémiques restent mal définis. Dans les cellules animales, le cœur du réseau de régulation du fer est organisé à travers le système régulateur IRE-IRP. Les *Iron Regulatory Proteins* (IRP), agissent sur la traduction de nombreuses protéines impliquées dans la gestion du fer par interaction avec les *Iron Responsive Elements* (IRE) localisés sur les régions non codantes des ARN messager (ARNm) régulés.

A partir de lignées cellulaires leucémiques (KG1, K562), de blastes de patients LAM et de progéniteurs CD34⁺ contrôles issus de sang de cordon et de moelle osseuse de donneurs sains, le statut du système de gestion cellulaire du fer a été caractérisé pour les premières étapes de l'hématopoïèse normale et pathologique. A travers la manipulation des apports cellulaires en fer, notamment par l'utilisation de chélateurs à usage thérapeutique, la réponse du système homéostatique a été suivie.

Nos données soulignent les faibles besoins en fer des progéniteurs hématopoïétiques, et d'autres cellules, pour proliférer. Dans les lignées cellulaires le régulateur IRP est en excès par rapport à ses cibles IRE, ce qui pourrait être une caractéristique générale du contrôle de la traduction pour des ARNm spécifiques par fixation de régulateurs translationnels. La régulation semble exclusivement le fait d'IRP1, puisque IRP2 n'a pas été détecté dans les progéniteurs hématopoïétiques, qu'ils soit pathologiques ou non. De subtiles différences ont été identifiées dans les quantités des composants du réseau gérant le fer dans les cellules leucémiques en comparaison des cellules saines témoins, ainsi que des capacités différentes à croître dans un milieu minimal comportant des concentrations en fer précisément définies.

Les informations obtenues à travers ce travail pourraient bénéficier à l'élaboration de protocoles thérapeutiques, incluant notamment la manipulation du fer, dans les LAM ou d'autres pathologies.

Mots clés: Homéostasie du fer, leucémie aiguë myéloïde, régulation de la traduction, iron regulatory proteins, iron responsive element, prolifération cellulaire, différenciation.